

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP04/014337

International filing date: 16 December 2004 (16.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE
Number: 103 59 660.7
Filing date: 18 December 2003 (18.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 01 February 2005 (01.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



22 JAN 2005

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 103 59 660.7

Anmeldetag: 18. Dezember 2003

Anmelder/Inhaber: BASF Aktiengesellschaft, 67063 Ludwigshafen/DE

Bezeichnung: Psod-Expressionseinheiten

IPC: C 12 N, C 12 P

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 10. November 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Klostermeyer

Patentansprüche

1. Verwendung einer Nukleinsäure mit Promotoraktivität, enthaltend
- 5 A) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 oder
B) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist oder
- 10 C) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
D) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter A), B) oder C)
- zur Transkription von Genen.
- 15 2. Verwendung einer Expressionseinheit, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 und zusätzlich funktionell verknüpft eine Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet, zur Expression von Genen.
- 20 3. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Expressionseinheit enthält:
- 25 E) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder
F) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist oder
G) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
- 30 H) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter E), F) oder G).
4. Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Expressionseinheit aus einer Nukleinsäure der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 besteht.
- 35 5. Nukleinsäure mit Promotoraktivität, enthaltend
- A) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 oder
B) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 %

2

auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist
oder

C) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder

5 D) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter A), B) oder C),

mit der Maßgabe, dass die Nukleinsäure mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 ausgenommen ist.

10 6. Expressionseinheit, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 5 und zusätzlich funktionell verknüpft eine Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet.

7. Expressionseinheit nach Anspruch 6, enthaltend

15

E) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder

F) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist oder

20

G) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder

H) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter E), F) oder G),

25

mit der Maßgabe, dass die Nukleinsäure mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 ausgenommen ist.

8. Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp durch

30

a) Veränderung der spezifischen Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von endogenen Genen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp oder

35

b) Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

40

- 5 9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man
- 10 b1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder
- 15 b2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder
- 20 b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.
- 25 10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp
- 30 ah) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von endogenen Genen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder
- 35 bh) die Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.
- 40 11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit

Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man

5

bh1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

10

bh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

15

bh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

20

12. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Reduzierung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp

25

ar) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp reduziert oder

30

br) Nukleinsäuren mit reduzierter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription endogene Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit reduzierter Promotoraktivität erfolgt.

35

13. Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate eines Gens in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp durch

5

- c) Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität im Mikroorganismus von endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp oder

5

- d) Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c), wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

10

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man

15

- d1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten erfolgt oder

20

- d2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

25

- d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

30

15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung oder Verursachung der Expressionsrate eines Gens in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp

35

- ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression der

40

endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

- 5 dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

- 10 16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man

- 15 dh1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder
- 20

- dh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder
- 25

- dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.
- 30

- 35 17. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Reduzierung der Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp

- cr) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von endogenen, Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression der

endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp reduziert oder

dr) Expressionseinheiten mit reduzierter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform cr) in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression endogener Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten mit reduzierter Expressionsaktivität erfolgt.

5

10

15

20

25

30

35

40

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Enzymen, wobei die Gene gegebenenfalls weitere Regulationselemente enthalten können.

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren ausgewählt sind aus der Gruppe Aspartatkinase, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Decarboxylase, Dihydrodipicolinate-Synthetase, Dihydrodipicolinate-Reduktase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase, Pyruvat-Carboxylase, Triosephosphat-Isomerase, Transkriptioneller Regulator LuxR, Transkriptioneller Regulator LysR1, Transkriptioneller Regulator LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Transketolase, Transaldolase, Homoserin-O-Acetyltransferase, Cystathionin-gamma-Synthase, Cystathionin-beta-Lyase, Serin-Hydroxymethyltransferase, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, Methylentetrahydrofolat-Reduktase, Phosphoserin-Aminotransferase, Phosphoserin-Phosphatase, Serin-Acetyl-Transferase, Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin-Kinase, Threonin-Synthase, Threonin-Exporter-Carrier, Threonin-Dehydratase, Pyruvat-Oxidase, Lysin-Exporter, Biotin-Ligase, Cystein-

Synthase, Cystein-Synthase II, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase, Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1 und 2, Phosphoadenosin Phosphosulfat Reduktase, Ferredoxin-sulfit-reductase, Ferredoxin NADP Reduktase, 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase, RXA00655 Regulator, RXN2910-Regulator, Arginyl-t-RNA-Synthetase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Threonin Efflux-Protein, Serinhydroxymethyltransferase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein der Sulfat-Reduktion RXA247, Protein OpcA, 1-Phosphofruktokinase und 6-Phosphofruktokinase.

20. Expressionskassette, umfassend

a) mindestens eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3 und

b) mindestens eine weitere, zu exprimierende Nukleinsäuresequenz, und

c) gegebenenfalls weitere genetische Kontrollelemente,

wobei mindestens eine Expressionseinheit und eine weitere, zu exprimierende, Nukleinsäuresequenz funktionell miteinander verknüpft sind und die weitere, zu exprimierende, Nukleinsäuresequenz in Bezug auf die Expressionseinheit heterolog ist.

21. Expressionskassette nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass die weitere, zu exprimierende Nukleinsäuresequenz ausgewählt ist der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Enzymen

- 5 22. Expressionskassette nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren ausgewählt sind aus der Gruppe Aspartatkinase, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Decarboxylase, Dihydrodipicolinate-Synthetase, Dihydrodipicolinate-Reduktase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase, Pyruvat-Carboxylase, Triosephosphat-Isomerase, Transkriptioneller Regulator LuxR, Transkriptioneller Regulator LysR1, Transkriptioneller Regulator LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Transketolase, Transaldolase, Homoserin-O-Acetyltransferase, Cystathionin-gamma-Synthase, Cystathionin-beta-Lyase, Serin-Hydroxymethyltransferase, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, Phosphoserin-Aminotransferase, Phosphoserin-Phosphatase, Serin-Acetyl-Transferase, Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin-Kinase, Threonin-Synthase, Threonin-Exporter-Carrier, Threonin-Dehydratase, Pyruvat-Oxidase, Lysin-Exporter, Biotin-Ligase, Cystein-Synthase I, Cystein-Synthase II, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1 und 2, Phosphoadenosin Phosphosulfat Reduktase, Ferredoxin-sulfit-reductase, Ferredoxin NADP Reduktase, 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase, RXA00655 Regulator, RXN2910-Regulator, Arginyl-t-RNA-Synthetase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Threonin Efflux-Protein, Serin-hydroxymethyltransferase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein der Sulfat-Reduktion RXA247, Protein OpcA, 1-Phosphofruktokinase und 6-Phosphofruktokinase
- 10 23. Expressionsvektor enthaltend eine Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 20 bis 22.
- 15 24. Genetisch veränderter Mikroorganismus, wobei die genetische Veränderung zu einer Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp führt und bedingt ist durch
- 20 a) Veränderung der spezifischen Promotoraktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription mindestens eines endogenen Gens reguliert oder
- 25
- 30
- 35

b) Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

5

25. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man

10

b1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

15

20

b2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

25

b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

30

26. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 24 oder 25 mit erhöhter oder verursachter Transkriptionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, dadurch gekennzeichnet, dass

35

ah) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von endogenen Genen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist oder

40

bh) die Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform ah) reguliert wird, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

5

27. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man

10

bh1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

15

20

bh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

25

bh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

30

28. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 24 oder 25 mit reduzierter Transkriptionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, dadurch gekennzeichnet dass,

35

ar) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von mindestens einem, endogenen Gen reguliert, im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist oder

40

br) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit reduzierter Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) in das Genom des Mikroorganismus eingebracht wurden, so dass die Transkription mindestens eines endogenen Gens unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit reduzierter Promotoraktivität erfolgt.

5

29. Genetisch veränderter Mikroorganismus, wobei die genetische Veränderung zu einer Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp führt und bedingt ist durch

10

c) Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression mindestens eines endogenen Gens reguliert, im Vergleich zum Wildtyp oder

15

d) Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

20

30. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man

25

d1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

30

d2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

35

40

d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressions-einheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

5

31. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 29 oder 30 mit erhöhter oder verursachter Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp, dadurch gekennzeichnet, dass man

10

ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression der endogenen Gene reguliert, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

15

dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

20

32. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man

25

dh1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

30

dh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

35

dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

5

33. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 29 oder 30 mit reduzierter Expressionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, dadurch gekennzeichnet dass,

10

cr) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression von mindestens einem endogenen Gen reguliert, im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist oder

15

dr) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit reduzierter Expressionsaktivität in das Genom des Mikroorganismus eingebracht wurden, so dass die Expression mindestens eines Gens unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3 mit reduzierter Expressionsaktivität erfolgt.

20

34. Genetisch veränderter Mikroorganismus, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3 und funktionell verknüpft ein zu exprimierendes Gen, wobei das Gen im Bezug auf die Expressionseinheit heterolog ist.

25

35. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 34, enthaltend eine Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 20 bis 22.

30

36. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 24 bis 35, dadurch gekennzeichnet, dass die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindungen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein

35

40

aus dem Biosyntheseweg von Enzymen, wobei die Gene gegebenenfalls weitere Regulationselemente enthalten können.

- 5 37. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, dass die Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren ausgewählt sind aus der Gruppe Aspartatkinase, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Decarboxylase, Dihydrodipicolinate-Synthetase, Dihydrodipicolinate-Reduktase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase, Pyruvat-Carboxylase, Triosephosphat-Isomerase, Transkriptioneller Regulator LuxR, Transkriptioneller Regulator LysR1, Transkriptioneller Regulator LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Transketolase, Transaldolase, Homoserin-O-Acetyltransferase, Cystathionin-gamma-Synthase, Cystathionin-beta-Lyase, Serin-Hydroxymethyltransferase, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, Phosphoserin-Aminotransferase, Phosphoserin-Phosphatase, Serin-Acetyl-Transferase, Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin-Kinase, Threonin-Synthase, Threonin-Exporter-Carrier, Threonin-Dehydratase, Pyruvat-Oxidase, Lysin-Exporter, Biotin-Ligase, Cystein-Synthase I, Cystein-Synthase II, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1 und 2, Phosphoadenosin Phosphosulfat Reduktase, Ferredoxin-sulfit-reductase, Ferredoxin NADP Reduktase, 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase, RXA00655 Regulator, RXN2910-Regulator, Arginyl-t-RNA-Synthetase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Threonin Efflux-Protein, Serinhydroxymethyltransferase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein OpcA, 1-Phosphofruktokinase und 6-Phosphofruktokinase.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
38. Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen gemäß einem der Ansprüche 24 bis 37.
- 35
39. Verfahren zur Herstellung von Lysin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen gemäß einem der Ansprüche 24, 25, 31 oder 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Diaminopimelat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Diaminopimelat-
- 40

16

- 5
10
15
20
25
30
35
40
- Decarboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Dihydrodipicolinate-Synthetase, Nukleinsäuren kodierend eine Dihydridipicolinate-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-Phosphoglycerat-Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat-Isomerase, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LuxR, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LysR1, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LysR2, Nukleinsäuren kodierend eine Malat-Quinon-Oxodoreduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Transketolase, Nukleinsäuren kodierend eine Transaldolase, Nukleinsäuren kodierend einen Lysin Exporter, Nukleinsäuren kodierend eine Biotin-Ligase, Nukleinsäuren kodierend eine Arginyl-t-RNA-Synthetase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Fruktose-1,6-bisphosphatase, Nukleinsäuren kodierend ein Protein OPCA, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Phosphofructokinase und Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphofructokinase,
40. Verfahren nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Diaminopimelat-Dehydrogenase-Aktivität, Diaminopimelat-Decarboxylase-Aktivität, Dihydrodipicolinate-Synthetase-Aktivität, Dihydridipicolinate-Reduktase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat-Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat-Isomerase-Aktivität, Aktivität des Transkriptionellen Regulators LuxR, Aktivität des Transkriptionellen Regulators LysR1, Aktivität des Transkriptionellen Regulators LysR2, Malat-Quinon-Oxodoreduktase-Aktivität, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase-Aktivität, Transketolase-Aktivität, Transaldolase-Aktivität, Lysin-Exporter-Aktivität, Arginyl-t-RNA-Synthetase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität, Fruktose-1,6-bisphosphatase-Aktivität, Protein OPCA-Aktivität, 1-Phosphofructokinase-Aktivität, 6-Phosphofructokinase-Aktivität und Biotin-Ligase-Aktivität aufweisen.
41. Verfahren nach Anspruch 39 oder 40, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der

5 Gruppe Threonin Dehydratase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Homoserine-Kinase-Aktivität, Homoserin-Dehydrogenase-Aktivität, Threonin-Exporter-Aktivität, Threonin-Efflux-Protein-Aktivität, Asparaginase-Aktivität, Aspartat-Decarboxylase-Aktivität und Threonin-Synthase-Aktivität aufweisen.

10 42. Verfahren zur Herstellung von Methionin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen gemäß einem der Ansprüche 24, 25, 31 oder 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-Phosphoglycerat Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat Isomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin O-Acetyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystathionin-gamma-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystathionin-beta-Lyase, Nukleinsäuren kodierend eine Serin-Hydroxymethyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, Nukleinsäuren kodierend eine Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoserin-Aminotransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoserin-Phosphatase, Nukleinsäuren kodierend eine Serine Acetyl-Transferase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystein-Synthase I, Nukleinsäuren kodierend eine Cystein-Synthase II, Nukleinsäuren kodierend eine Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Sulfat-Adenylyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoadenosin-Phosphosulfat-Reductase, Nukleinsäuren kodierend eine Ferredoxin-Sulfit-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Ferredoxin NADPH-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Ferredoxin-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA247, Nukleinsäuren kodierend einen RXA0655 Regulator und Nukleinsäuren kodierend einen RXN2910 Regulator.

40 43. Verfahren nach Anspruch 42, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Ho-

- 5 moserin Dehydrogenase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat Isomerase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, Cystathionin-gamma-Synthase-Aktivität, Cystathionin-beta-Lyase-Aktivität Serin-Hydroxymethyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase-Aktivität, Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase-Aktivität, Phosphoserin-Aminotransferase-Aktivität, Phosphoserin-Phosphatase-Aktivität, Serin Acetyl-Transferase-Aktivität, Cystein-Synthase Aktivität I-Aktivität, Cystein-Synthase Aktivität II, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfat-Adenylyltransferase-Aktivität, Phosphoadenosin-Phosphosulfat-Reductase-Aktivität, Ferredoxin-Sulfit-Reduktase-Aktivität, Ferredoxin NADPH-Reduktase Aktivität, Ferredoxin-Aktivität, Aktivität Proteins der Sulfat-Reduktion RXA077, Aktivität eines Proteins der Sulfat-Reduktion RXA248, Aktivität eines Proteins der Sulfat-Reduktion RXA247, Aktivität eines RXA655-Regulators und Aktivität eines RXN2910-Regulators aufweisen.
- 10
- 15
- 20 44. Verfahren nach Anspruch 42 oder 43, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Homoserine-Kinase-Aktivität, Threonin-Dehydratase-Aktivität, Threonin Synthase-Aktivität, Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Synthase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Reduktase-Aktivität und Diaminopicolinat Decarboxylase-Aktivität aufweisen.
- 25
- 30 45. Verfahren zur Herstellung von Threonin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen gemäß einem der Ansprüche 24, 25, 31 oder 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-Phosphoglycerat Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat Isomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin-Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Threonin Synthase, Nukleinsäuren kodierend einen Threonin Exporter Carrier, Nukleinsäuren kodierend eine Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Transaldolase, Nukleinsäuren kodierend eine Transketolase, , Nukleinsäuren kodierend einer Malat-Quinon-Oxidoreductase, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend
- 35
- 40

- 5 einen Lysin-Exporter, Nukleinsäuren kodierend eine Biotin-Ligase, , Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend ein Threonin Efflux-Protein, Nukleinsäuren kodierend eine Fruktose-1,6-bisphosphatase, Nukleinsäuren kodierend ein OpcA Protein, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Phosphofructokinase, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphofructokinase, und Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin-Dehydrogenase
- 10 46. Verfahren nach Anspruch 45, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat Isomerase-Aktivität, Threonin Synthase-Aktivität, Aktivität eines Threonin Export-Carriers, Transaldolase-Aktivität, Transketolase-Aktivität, Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase-Aktivität, Malat-Qinon-Oxidoreductase-Aktivität, Homoserin-Kinase-Aktivität, Biotin-Ligase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität, Threonin-Efflux-Protein-Aktivität, Protein OpcA-Aktivität, 1-Phosphofructokinase-Aktivität, 6-Phosphofructokinase-Aktivität, Fruktose 1,6 bisphosphatase-Aktivität, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase und Homoserin-Dehydrogenase-Aktivität aufweisen.
- 15 47. Verfahren nach Anspruch 45 oder 46, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Threonin Dehydratase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, Serin-Hydroxymethyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase-Aktivität, Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Synthetase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Reduktase-Aktivität, Asparaginase-Aktivität, Aspartat-Decarboxylase-Aktivität, Lysin-Exporter-Aktivität, Acetolactat-Synthase-Aktivität , Ketol-Aid-Reductoisomerase- Aktivität, Branched chain aminotransferase- Aktivität, Coenzym B12-abhängige Methionin Synthase- Aktivität, Coenzym B12-unabhängige Methion Synthase-Aktivität, Dihydroxy-acid Dehydratase- Aktivität und Diaminopicolinat Decarboxylase-Aktivität aufweisen.
- 20 48. Verfahren nach einem der Ansprüche 38 bis 47, dadurch gekennzeichnet, dass die biosynthetischen Produkte nach und/oder während des Kultivierungs-
- 25
- 30
- 35
- 40

schrilles aus dem Kultivierungsmedium isoliert und gegebenenfalls aufgereinigt werden.

- 5 49. Verwendung der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 44 als ribosomale Bindungsstelle in Expressionseinheiten, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglichen.
- 10 50. Verwendung der Nukleinsäuresequenzen SEQ. ID. NOs. 42 oder 43 als -10-Region in Expressionseinheiten, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglichen.
- 15 51. Expressionseinheit, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglicht, enthaltend die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 44.
- 20 52. Expressionseinheit gemäß Anspruch 51, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 44. als ribosomale Bindungsstelle verwendet wird.
- 25 53. Expressionseinheit, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglicht, enthaltend mindestens eine der Nukleinsäuresequenzen SEQ. ID. NOs. 42 oder 43.
54. Expressionseinheit gemäß Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, dass eine der Nukleinsäuresequenzen SEQ. ID. NOs. 42 oder 43 als -10-Region verwendet wird.

Psod-Expressionseinheiten

Beschreibung

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Nukleinsäuresequenzen zur Regulation der Transkription und Expression von Genen, die neuen Promotoren und Expressionseinheiten selbst, Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen, Expressionskassetten, enthal-
- 10 oder verursachter Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate sowie Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten durch Kultivierung der genetisch veränderten Mikroorganismen.

- 15 Verschiedene biosynthetische Produkte, wie beispielsweise Feinchemikalien, wie unter anderem Aminosäuren, Vitamine aber auch Proteine werden über natürliche Stoffwechselprozesse in Zellen hergestellt und werden in vielen Industriezweigen verwendet, einschließlich der Nahrungsmittel-, Futtermittel-, Kosmetik-, Feed-, Food- und pharmazeutischen Industrie. Diese Substanzen, die zusammen als Feinchemika-
- 20 lien/Proteine bezeichnet werden, umfassen unter anderem organische Säuren, sowohl proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, Nukleotide und Nukleoside, Lipide und Fettsäuren, Diöle, Kohlenhydrate, aromatische Verbindungen, Vitamine und Cofaktoren, sowie Proteine und Enzyme. Ihre Produktion erfolgt am zweckmäßigsten im Großmaßstab mittels Anzucht von Bakterien, die entwickelt wurden, um große
- 25 Mengen der jeweils gewünschten Substanz zu produzieren und sezernieren. Für diesen Zweck besonders geeignete Organismen sind coryneforme Bakterien, gram-positive nicht-pathogene Bakterien.

- 30 Es ist bekannt, dass Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere *Corynebacterium glutamicum*, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen, wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien, wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zum Produkt, beispielsweise durch Ionenaustauschchroma-
- 35 tographie aber auch Sprühtrocknung, oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

- 40 Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von Feinchemikalien/Proteine produzierender Stämme von *Corynebacterium* eingesetzt, indem man einzelne Gene amplifiziert und die Auswirkung auf die Produktion von Feinchemikalien/Proteine untersucht.

2

- Andere Wege, um ein Verfahren für die Herstellung Feinchemikalien, Aminosäuren oder Proteine zu entwickeln, oder die Produktivität eines bereits existierenden Verfahrens für die Herstellung Feinchemikalien, Aminosäuren oder Proteine zu erhöhen bzw. zu verbessern, sind die Expression eines oder mehrerer Gene zu erhöhen bzw. zu verändern und oder die Translation einer mRNA durch geeignete Polynukleotidsequenzen zu beeinflussen. Beeinflussung kann in diesem Zusammenhang die Erhöhung, Verringerung, oder auch andere Parameter der Expression von Genen wie zeitliche Expressionsmuster umfassen.
- 10 Dem Fachmann sind unterschiedliche Bestandteile von bakteriellen Regulationssequenzen bekannt. Man unterscheidet die Bindungstellen von Regulatoren, auch Operatoren genannt, die Bindungstellen von RNA-Polymerase-Holoenzymen, auch -35 und -10 Regionen genannt, und die Bindungsstelle von Ribosomaler 16S-RNA, auch Ribosomale Bindungsstelle oder auch Shine-Dalgarno-Sequenz genannt.
- 15 Als Sequenz einer Ribosomalen Bindungsstelle, auch Shine-Dalgarno-Sequenz genannt, im Sinne dieser Erfindung werden Polynukleotidsequenzen verstanden, die sich bis zu 20 Basen stromauf des Initiationskodons der Translation befinden.
- 20 In der Literatur (E. coli und S. typhimurium, Neidhardt F.C. 1995 ASM Press) wird beschrieben, dass sowohl die Zusammensetzung der Polynukleotidsequenz der Shine-Dalgarno-Sequenz, die Sequenzabfolge der Basen, aber auch der Abstand einer in der Shine-Dalgarno-Sequenz enthaltenen Polynukleotidsequenz zum einen wesentlichen Einfluss auf die Initiationsrate der Translation hat.
- 25 Nukleinsäuresequenzen mit Promotoraktivität können die Bildung von mRNA auf unterschiedliche Weise beeinflussen. Promotoren, deren Aktivität unabhängig von der physiologischen Wachstumsphase des Organismus sind, nennt man konstitutiv. Wiederum andere Promotoren reagieren auf externe chemische, wie physikalische Stimuli wie Sauerstoff, Metabolite, Hitze, pH, etc.. Wiederum andere zeigen in unterschiedlichen Wachstumsphasen eine starke Abhängigkeit ihrer Aktivität. Beispielsweise sind in der Literatur Promotoren beschrieben, die während der exponentiellen Wachstumsphase von Mikroorganismen eine besonders ausgeprägte Aktivität zeigen, oder aber auch genau in der stationären Phase des mikrobiellen Wachstums. Beide Charakteristika von Promotoren können für eine Produktion von Feinchemikalien und Proteine je nach Stoffwechselweg einen günstigen Einfluss auf die Produktivität haben.
- 35 Zum Beispiel kann man Promotoren die während des Wachstums die Expression eines Gens ausschalten, diese aber nach einem optimalen Wachstum anschalten dazu nutzen, ein Gen zu regulieren, das die Produktion eines Metaboliten kontrolliert. Der
- 40

veränderte Stamm weist dann die gleichen Wachstumsparameter wie der Ausgangsstamm auf, produziert aber mehr Produkt pro Zelle. Diese Art der Modifizierung kann sowohl den Titer (g Produkt/Liter) als auch die C-Ausbeute (g Produkt/g-C-Quelle) erhöhen.

5

In *Corynebacterium* Spezies konnten bereits solche Nukleotidsequenzen isoliert werden, die für eine Erhöhung bzw. eine Abschwächung der Genexpression genutzt werden können. Diese regulierten Promotoren können die Rate, mit der ein Gen transkribiert wird, abhängig von den internen und/oder externen Bedingungen der Zelle erhöhen oder erniedrigen. Zum Teil kann die Anwesenheit eines bestimmten Faktors, bekannt als Inducer, die Rate der Transkription vom Promotor stimulieren. Inducer können direkt oder aber indirekt die Transkription vom Promotor beeinflussen. Eine andere Klasse von Faktoren, bekannt als Suppressoren ist in der Lage, die Transkription vom Promotor zu reduzieren oder aber zu inhibieren. Wie auch die Inducer, können auch die Suppressoren direkt oder indirekt wirken. Es sind jedoch auch Promotoren bekannt, die über die Temperatur reguliert werden. So kann der Level der Transkription solcher Promotoren zum Beispiel durch eine Erhöhung der Wachstumstemperatur über die normale Wachstumstemperatur der Zelle erhöht oder aber abgeschwächt werden.

10

15

Eine geringe Anzahl von Promotoren aus *C. glutamicum* wurden bis zum heutigen Tag beschrieben. Der Promotor des Malatsynthase-Gens aus *C. glutamicum* wurde im DE 4440118 beschrieben. Dieser Promotor wurde einem für ein Protein kodierendes Strukturgen vorgeschaltet. Nach Transformation eines solchen Konstrukts in ein coryneform-Bakterium wird die Expression des dem Promotor nachgeschalteten Strukturgens reguliert. Die Expression des Strukturgens wird induziert sobald dem Medium ein entsprechender Induktor zugesetzt wird.

25

Reinscheid et al., Microbiology 145:503 (1999) haben eine transkriptionelle Fusion zwischen dem pta-ack Promotor aus *C. glutamicum* und einem Reportergen (Chloramphenicol Acetyltransferase) beschrieben. Zellen von *C. glutamicum*, die eine solche transkriptionelle Fusion enthalten, wiesen eine erhöhte Expression des Reportergenes bei Wachstum auf Acetat haltigem Medium auf. Im Vergleich dazu zeigten transformierte Zellen, die auf Glucose wuchsen, keine erhöhte Expression dieses Reportergens.

30

35

In Pa'tek et al., Microbiology 142:1297 (1996) wurden einige DNA Sequenzen aus *C. glutamicum* beschrieben, die die Expression eines Reportergens in *C. glutamicum* Zellen verstärken können, beschrieben. Diese Sequenzen wurden miteinander verglichen, um Consensus-Sequenzen für *C. glutamicum* Promotoren zu definieren.

40

Weitere DNA-Sequenzen aus *C. glutamicum*, die zur Regulation der Genexpression genutzt werden können, sind im Patent WO 02/40679 beschrieben worden. Diese isolierten Polynukleotide stellen Expressionseinheiten aus *Corynebakterium glutamicum* dar, die entweder zur Erhöhung oder aber zur Verringerung einer Genexpression genutzt werden können. Weiterhin sind in diesem Patent rekombinante Plasmide beschrieben, auf denen die Expressionseinheiten aus *Corynebakterium glutamicum* mit heterologen Genen assoziiert sind. Die hier beschriebene Methode, Fusion von einem Promotor aus *Corynebakterium glutamicum* mit einem heterologen Gen, kann unter anderem zur Regulation der Gene der Aminosäurebiosynthese eingesetzt werden.

10

Der Erfindung lag die Aufgabe zugrunde weitere Promotoren und/oder Expressionseinheiten mit vorteilhaften Eigenschaften zur Verfügung zu stellen.

15

Demgemäß wurde gefunden, dass man Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, enthaltend

20

A) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 oder

B) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist
oder

C) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder

D) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter A), B) oder C)

25

zur Transkription von Genen verwenden kann.

30

Unter „Transkription“ wird erfindungsgemäß der Prozess verstanden, durch den ausgehend von einer DNA-Matrize ein komplementäres RNA-Molekül hergestellt wird. An diesem Prozess sind Proteine wie die RNA-Polymerase sogenannte Sigma-Faktoren und transkriptionelle Regulatorproteine beteiligt. Die synthetisierte RNA dient dann als Matrize im Prozess der Translation, der dann zum biosynthetisch aktiven Protein führt.

35

Die Bildungsrate, mit der ein biosynthetisch aktives Protein hergestellt wird, ist ein Produkt aus der Rate der Transkription und der Translation. Beide Raten können erfindungsgemäß beeinflusst werden und damit die Rate der Bildung von Produkten in einem Mikroorganismus beeinflussen.

5

Unter einem „Promotor“ oder einer „Nukleinsäure mit Promotoraktivität“ wird erfindungsgemäß eine Nukleinsäure verstanden, die in funktioneller Verknüpfung mit einer zu transkribierenden Nukleinsäure, die Transkription dieser Nukleinsäure reguliert.

- 5 Unter einer „funktionellen Verknüpfung“ versteht man in diesem Zusammenhang beispielsweise die sequentielle Anordnung einer der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität und einer zu transkribierenden Nukleinsäuresequenz und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel Nukleinsäuresequenzen, die die Transkription von Nukleinsäuren gewährleisten, sowie zum Beispiel einen Terminator
- 10 derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Transkription der der Nukleinsäuresequenz erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die zu transkribierende Nukleinsäuresequenz hinter (d.h. am 3'-Ende) der erfindungsgemäßen Promotorsequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der Promotorsequenz und der transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als
- 15 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare.
- 20

Unter „Promotoraktivität“ wird erfindungsgemäß die in einer bestimmten Zeit durch den Promotor gebildete Menge RNA, also die Transkriptionsrate verstanden.

- 25 Unter „spezifischer Promotoraktivität“ wird erfindungsgemäß die in einer bestimmten Zeit durch den Promotor gebildete Menge RNA pro Promotor verstanden.

Unter dem Begriff „Wildtyp“ wird erfindungsgemäß der entsprechende Ausgangsmikroorganismus verstanden.

- 30 Je nach Zusammenhang kann unter dem Begriff „Mikroorganismus“ der Ausgangsmikroorganismus (Wildtyp) oder ein erfindungsgemäßer, genetisch veränderter Mikroorganismus oder beides verstanden werden.

- 35 Vorzugsweise und insbesondere in Fällen, in denen der Mikroorganismus oder der Wildtyp nicht eindeutig zugeordnet werden kann, wird unter „Wildtyp“ für die Veränderung oder Verursachung der Promotoraktivität oder Transkriptionsrate, für die Veränderung oder Verursachung der Expressionsaktivität oder Expressionsrate und für die Erhöhung des Gehalts an biosynthetischen Produkten jeweils ein Referenzorganismus

verstanden.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist dieser Referenzorganismus *Corynebakterium glutamicum* ATCC 13032.

5

In einer bevorzugten Ausführungsform werden Ausgangsmikroorganismen verwendet die bereits in der Lage sind, die gewünschte Feinchemikalie herzustellen. Besonders bevorzugt sind dabei unter den besonders bevorzugten Mikroorganismen der Bakterien der Gattung *Corynebacterien* und den besonders bevorzugten Feinchemikalien L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin, diejenigen Ausgangsmikroorganismen die bereits in der Lage sind, L-Lysin, L-Methionin und/oder L-Threonin herzustellen. Dies sind besonders bevorzugt *Corynebakterien* bei denen beispielsweise das Gen kodierend für eine Aspartokinase (ask-Gen) dereguliert ist oder die feed-back-Inhibierung aufgehoben oder reduziert ist. Beispielsweise weisen solche Bakterien im ask-Gen eine Mutation auf, die zu einer Reduzierung oder Aufhebung der feed-back-Inhibierung führen, wie beispielsweise die Mutation T3111.

10

15

Bei einer „verursachten Promotoraktivität“ oder Transkriptionsrate im Bezug auf ein Gen im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp die Bildung einer RNA verursacht, die im Wildtyp so nicht vorhanden war.

20

Bei einer veränderten Promotoraktivität oder Transkriptionsrate im Bezug auf ein Gen im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit die gebildete Menge der RNA verändert.

25

Unter „verändert“ wird in diesem Zusammenhang bevorzugt erhöht oder erniedrigt verstanden.

30

Dies kann beispielsweise durch Erhöhung oder Reduzierung der spezifischen Promotoraktivität des endogenen erfindungsgemäßen Promotors, beispielsweise durch Mutation des Promotors oder durch Stimulierung oder Hemmung des Promotors erfolgen.

35

Weiterhin kann die erhöhte Promotoraktivität oder Transkriptionsrate beispielsweise durch Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität erreicht werden, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

40

Vorzugsweise wird die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch Nukleinsäu-

ren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität dadurch erreicht, dass man

5 eine oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten erfindungsgemäßen Nukleinsäure mit Promotoraktivität gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

10 ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

15 ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

20 Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität enthalten

- 20 A) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 oder
- B) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist oder
- 25 C) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
- D) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter A), B) oder C)

30 Die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 stellt die Promotorsequenz der Superoxid-Dismutase (Psod) aus Corynebakterium glutamicum dar. SEQ. ID. NO. 1 entspricht der Promotorsequenz des Wildtyps.

35 Die Erfindung betrifft weiterhin Nukleinsäuren mit Promotoraktivität enthaltend eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist.

40 Weitere natürliche erfindungsgemäße Beispiele für erfindungsgemäße Promotoren lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Identitätsvergleiche der Nukleinsäuresequenzen aus Daten-

banken mit der vorstehend beschriebenen Sequenzen SEQ ID NO: 1 leicht auffinden.

Künstliche erfindungsgemäße Promotor-Sequenzen lassen sich ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 1 durch künstliche Variation und Mutation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden leicht auffinden.

Unter dem Begriff "Substitution" ist in der Beschreibung der Austausch einer oder mehrerer Nukleotide durch ein oder mehrere Nukleotide zu verstehen. „Deletion“ ist das Ersetzen eines Nukleotides durch eine direkte Bindung. Insertionen sind Einfügungen von Nukleotiden in die Nukleinsäuresequenz, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere Nukleotide ersetzt wird.

Unter Identität zwischen zwei Nukleinsäuren wird die Identität der Nukleotide über die jeweils gesamte Nukleinsäurelänge verstanden, insbesondere die Identität die durch Vergleich mit Hilfe der Vector NTI Suite 7.1 Software der Firma Informax (USA) unter Anwendung der Clustal Methode (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl. Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Multiple alignment parameter:
Gap opening penalty 10
Gap extension penalty 10
Gap separation penalty range 8
Gap separation penalty off
% identity for alignment delay 40
Residue specific gaps off
Hydrophilic residue gap off
Transition weighing 0

Pairwise alignment parameter:
FAST algorithm on
K-tuplesize 1
Gap penalty 3
Window size 5
Number of best diagonals 5

Unter einer Nukleinsäuresequenz, die eine Identität von mindestens 90 % mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 aufweist, wird dementsprechend eine Nukleinsäuresequenz verstanden, die bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 1, ins-

besondere nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 90 % aufweist.

5 Besonders bevorzugte Promotoren weisen mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 eine Identität von 91%, bevorzugter 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, besonders bevorzugt 99% auf.

10 Weitere natürliche Beispiele für Promotoren lassen sich weiterhin ausgehend von den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, insbesondere ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 1 aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungstechniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

15 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft daher Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, enthaltend eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. No. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Diese Nukleinsäuresequenz umfasst mindestens 10, bevorzugter mehr als 12, 15, 30, 50 oder besonders bevorzugt mehr als 150 Nukleotide.

20 Die Hybridisierung erfolgt erfindungsgemäß unter stringenten Bedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 beschrieben:

25 Unter stringenten Hybridisierungs-Bedingungen werden insbesondere verstanden: Die über Nacht Inkubation bei 42°C in einer Lösung bestehend aus 50 % Formamid, 5 x SSC (750 mM NaCl, 75 mM Tri-Natrium Citrat), 50 mM Natrium Phosphat (pH 7,6), 5x Denhardt Lösung, 10% Dextransulfat und 20 g/ml denaturierte, gescheerte Lachsspermien-DNA, gefolgt von einem Waschen der Filter mit 0,1x SSC bei 65°C.

30 Unter einem „funktionell äquivalenten Fragment“ werden für Nukleinsäuresequenzen mit Promotoraktivität, Fragmente verstanden die im wesentlichen die gleiche oder eine höhere spezifische Promotoraktivität aufweisen wie die Ausgangssequenz.

35 Unter „im wesentlichen gleich“ wird eine spezifische Promotoraktivität verstanden die mindestens 50%, vorzugsweise 60%, bevorzugter 70%, bevorzugter 80%, bevorzugter 90%, besonders bevorzugt 95% der spezifischen Promotoraktivität der Ausgangssequenz aufweist.

40

10

Unter „Fragmente“ werden Teilsequenzen der durch Ausführungsform A), B) oder C) beschriebenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität verstanden. Vorzugweise weisen diese Fragmente mehr als 10, bevorzugter aber mehr als 12, 15, 30, 50 oder besonders bevorzugts mehr als 150 zusammenhängende Nukleotide der Nukleinsäuresequenz
5 SEQ. ID. NO. 1 auf.

Besonders bevorzugt ist die Verwendung der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 als Promotor, d.h. zur Transkription von Genen.

10 Die SEQ. ID. NO. 1 ist ohne Funktionszuordnung im Genbank-Eintrag AP005283 beschrieben worden. Daher betrifft die Erfindung ferner die neuen, erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen mit Promotoraktivität.

Insbesondere betrifft die Erfindung eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität, enthaltend

15

- A) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 oder
- B) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist
20 oder
- C) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
- D) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter A), B) oder C),

25 mit der Maßgabe, dass die Nukleinsäure mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 ausgenommen ist.

Alle vorstehend erwähnten Nukleinsäuren mit Promotoraktivität sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoramiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, S. 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory
35 manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung einer Expressionseinheit, enthaltend eine
40 der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität und zusätzlich funktionell

verknüpft eine Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet, zur Expression von Genen.

5 Unter einer Expressionseinheit wird erfindungsgemäß eine Nukleinsäure mit Expressionsaktivität verstanden, also eine Nukleinsäure verstanden, die in funktioneller Verknüpfung mit einer zu exprimierenden Nukleinsäure oder Gens, die Expression, also die Transkription und die Translation dieser Nukleinsäure oder dieses Gens reguliert.

10 Unter einer „funktionellen Verknüpfung“ versteht man in diesem Zusammenhang beispielsweise die sequentielle Anordnung einer der erfindungsgemäßen Expressionseinheit und einer transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der transgenen Expression der Nukleinsäuresequenz erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz hinter (d.h. am 3'-Ende) der erfindungsgemäßen Expressionseinheitssequenz positioniert wird, so dass beide
20 Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der Expressionseinheitssequenz und der transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare.

25 Unter „Expressionsaktivität“ wird erfindungsgemäß die in einer bestimmten Zeit durch die Expressionseinheit gebildete Menge Protein, also die Expressionsrate verstanden.

30 Unter „spezifischer Expressionsaktivität“ wird erfindungsgemäß die in einer bestimmten Zeit durch die Expressionseinheit gebildete Menge Protein pro Expressionseinheit verstanden.

Bei einer „verursachten Expressionsaktivität“ oder Expressionsrate im Bezug auf ein Gen im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp die Bildung eines Proteins verursacht, das im Wildtyp so nicht vorhanden war.

35

Bei einer „veränderten Expressionsaktivität“ oder Expressionsrate im Bezug auf ein Gen im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit die gebildete Menge des Proteins verändert.

12

Unter „verändert“ wird in diesem Zusammenhang bevorzugt erhöht oder erniedrigt verstanden.

- 5 Dies kann beispielsweise durch Erhöhung oder Reduzierung der spezifischen Aktivität der endogenen Expressionseinheit, beispielsweise durch Mutation der Expressionseinheit oder durch Stimulierung oder Hemmung der Expressionseinheit erfolgen.

- 10 Weiterhin kann die erhöhte Expressionsaktivität oder Expressionsrate beispielsweise durch Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch Expressionseinheiten mit Erhöhter spezifischer Expressionsaktivität erreicht werden, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

- 15 Vorzugsweise wird die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit Erhöhter spezifischer Expressionsaktivität dadurch erreicht, dass man

- 20 eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

- 25 ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

- 30 ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

- 35 Die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, enthalten eine erfindungsgemäße, vorstehend beschriebene Nukleinsäure mit Promotoraktivität und zusätzlich funktionell verknüpft eine Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet.

13

Vorzugsweise enthält diese Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet, die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 42 als ribosomale Bindungsstelle.

5 In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Expressionseinheit:

- 10 E) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder
- F) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist oder
- G) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
- H) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter E), F) oder G).

15

Die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 stellt die Nukleinsäuresequenz der Expressionseinheit der Superoxid-Dismutase (Psod) aus *Corynebakterium glutamicum* dar. SEQ. ID. NO. 2 entspricht der Sequenz der Expressionseinheit des Wildtyps.

20 Die Erfindung betrifft weiterhin Expressionseinheiten, enthaltend eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

25 Weitere natürliche erfindungsgemäße Beispiele für erfindungsgemäße Expressionseinheiten lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Identitätsvergleiche der Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der vorstehend beschriebenen Sequenzen SEQ ID NO: 2 leicht auffinden.

30

Künstliche erfindungsgemäße Sequenzen der Expressionseinheiten lassen sich ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 2 durch künstliche Variation und Mutation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden leicht auffinden.

35

Unter einer Nukleinsäuresequenz, die eine Identität von mindestens 90 % mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist, wird dementsprechend eine Nukleinsäuresequenz verstanden, die bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 2, insbesondere nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität

40 von mindestens 90 % aufweist.

Besonders bevorzugte Expressionseinheiten weisen mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 eine Identität von 91%, bevorzugter 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, besonders bevorzugt 99% auf.

5

Weitere natürliche Beispiele für Expressionseinheiten lassen sich weiterhin ausgehend von den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, insbesondere ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 2 aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungstechniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

10

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft daher Expressionseinheiten, enthaltend eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. No. 2 unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Diese Nukleinsäuresequenz umfasst mindestens 10, bevorzugter mehr als 12, 15, 30, 50 oder besonders bevorzugt mehr als 150 Nukleotide.

15

Unter "hybridisieren" versteht man die Fähigkeit eines Poly- oder Oligonukleotids unter stringenten Bedingungen an eine nahezu komplementäre Sequenz zu binden, während unter diesen Bedingungen unspezifische Bindungen zwischen nicht-komplementären Partnern unterbleiben. Dazu sollten die Sequenzen vorzugsweise zu 90-100%, komplementär sein. Die Eigenschaft komplementärer Sequenzen, spezifisch aneinander binden zu können, macht man sich beispielsweise in der Northern- oder Southern-Blot-Technik oder bei der Primerbindung in PCR oder RT-PCR zunutze.

20

25

Die Hybridisierung erfolgt erfindungsgemäß unter stringenten Bedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 beschrieben:

30

Unter stringenten Hybridisierungs-Bedingungen werden insbesondere verstanden: Die über Nacht Inkubation bei 42°C in einer Lösung bestehend aus 50 % Formamid, 5 x SSC (750 mM NaCl, 75 mM Tri-Natrium Citrat), 50 mM Natrium Phosphat (ph7,6), 5x Denhardt Lösung, 10% Dextransulfat und 20 g/ml denaturierte, gescheerte Lachsspermien-DNA, gefolgt von einem Waschen der Filter mit 0,1x SSC bei 65°C.

35

Die erfindungsgemäß Nukleotidsequenzen ermöglichen ferner die Erzeugung von Sonden und Primern, die zur Identifizierung und/oder Klonierung von homologer Sequenzen in anderen Zelltypen und Mikroorganismen verwendbar sind. Solche Sonden

40

bzw. Primer umfassen gewöhnlich einen Nukleotidsequenzbereich, der unter stringen-
ten Bedingungen an mindestens etwa 12, vorzugsweise mindestens etwa 25, wie z.B.
etwa 40, 50 oder 75 aufeinanderfolgende Nukleotide eines Sense-Stranges einer erfin-
dungsgemäßen Nukleinsäuresequenz oder eines entsprechenden Antisense-Stranges
5 hybridisiert.

Erfindungsgemäß umfasst sind auch solche Nukleinsäuresequenzen, die sogenannte
stumme Mutationen umfassen oder entsprechend der Codon-Nutzung eines speziellen
Ursprungs- oder Wirtsorganismus, im Vergleich zu einer konkret genannten Sequenz
10 verändert sind, ebenso wie natürlich vorkommende Varianten, wie z.B. Spleißvarianten
oder Allelvarianten, davon.

Unter einem „funktionell äquivalenten Fragment“ werden für Expressionseinheiten,
Fragmente verstanden die im wesentlichen die gleiche oder eine höhere spezifische
15 Expressionsaktivität aufweisen wie die Ausgangssequenz.

Unter „im wesentlichen gleich“ wird eine spezifische Expressionsaktivität verstanden
die mindestens 50%, vorzugsweise 60%, bevorzugter 70%, bevorzugter 80%, bevor-
zugter 90%, besonders bevorzugt 95% der spezifischen Expressionsaktivität der Aus-
gangssequenz aufweist.
20

Unter „Fragmente“ werden Teilsequenzen der durch Ausführungsform E), F) oder G)
beschriebenen Expressionseinheiten verstanden. Vorzugsweise weisen diese Frag-
mente mehr als 10, bevorzugter aber mehr als 12, 15, 30, 50 oder besonders bevor-
zugts mehr als 150 zusammenhängende Nukleotide der Nukleinsäuresequenz SEQ.
25 ID. NO. 1 auf.

Besonders bevorzugt ist die Verwendung der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 als
Expressionseinheit, d.h. zur Expression von Genen.
30

Die SEQ. ID. NO. 2 ist ohne Funktionszuordnung im Genbank-Eintrag AP005283 be-
schrieben worden. Daher betrifft die Erfindung ferner die neuen, erfindungsgemäßen
Expressionseinheiten.

35 Insbesondere betrifft die Erfindung eine Expressionseinheit, enthaltend eine erfin-
dungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität zusätzlich funktionell verknüpft eine
Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet.

Besonders bevorzugt betrifft die Erfindung eine Expressionseinheit, enthaltend
40

16

- E) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder
F) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist oder
5 G) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
H) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter E), F) oder G),

10 mit der Maßgabe, dass die Nukleinsäure mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 ausgenommen ist.

Die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten umfassen ein oder mehrere der folgenden genetischen Elemente: eine Minus 10 (" -10") Sequenz; eine Minus 35 (" -35") Sequenz; einen Transkriptionsstart, eine Enhancer Region; und eine Operator Region.

15 Vorzugsweise sind diese genetischen Elemente spezifisch für die Spezies Corynebakterien, speziell für *Corynebacterium glutamicum*.

20 Alle vorstehend erwähnten Expressionseinheiten sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, S. 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der
25 DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

30 Für die Erfindungen in diesem Patent wurden Methoden und Techniken genutzt, die dem Fachmann, der in mikrobiologischen und rekombinanten DNA-Techniken geübt ist, bekannt sind. Methoden und Techniken für das Wachstum von Bakterienzellen, das Einschleusen von isolierten DNA-Molekülen in die Wirtszelle, und die Isolierung, Klonierung und Sequenzierung von isolierten Nukleinsäuremolekülen usw. sind Beispiele
35 für solche Techniken und Methoden. Diese Methoden sind in vielen Standardliteraturstellen beschrieben: Davis et al., Basic Methods In Molecular Biology (1986); J. H. Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1972); J.H. Miller, A Short Course in Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1992); M. Singer and P. Berg, Genes & Genomes, University Science Books, Mill Valley, California
40

- (1991); J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); P.B. Kaufmann et al., Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine, CRC Press, Boca Raton, Florida (1995); Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, B.R. Glick and J.E. Thompson, eds., CRC Press, Boca Raton, Florida (1993); and P.F. Smith-Keary, Molecular Genetics of Escherichia coli, The Guilford Press, New York, NY (1989).

- 10 Alle Nukleinsäuremoleküle der vorliegenden Erfindung liegen bevorzugt in Form eines isolierten Nukleinsäuremoleküls vor. Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül wird von anderen Nukleinsäuremolekülen abgetrennt, die in der natürlichen Quelle der Nukleinsäure zugegen sind und kann überdies im wesentlichen frei von anderem zellulären Material oder Kulturmedium sein, wenn es durch rekombinante Techniken hergestellt wird, oder frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien sein, wenn es chemisch synthetisiert wird.

- 15 Die Erfindung umfasst weiterhin die zu den konkret beschriebenen Nukleotidsequenzen komplementären Nukleinsäuremoleküle oder einen Abschnitt davon.

- 20 Die erfindungsgemäßen Promotoren und/oder Expressionseinheiten lassen sich beispielsweise besonders vorteilhaft in verbesserten Verfahren zur fermentativen Herstellung von biosynthetischen Produkten wie nachstehend beschrieben verwenden.

- 25 Die erfindungsgemäßen Promotoren und/oder Expressionseinheiten weisen insbesondere den Vorteil auf, dass sie in Mikroorganismen durch Stress induziert werden. Durch geeignete Steuerung des Fermentationsprozesses lässt sich diese Stress-Induktion gezielt für eine Erhöhung der Transkriptions/Expressionsrate gewünschter Gene steuern. Insbesondere bei der Produktion von L-Lysin wird diese Stressphase sehr früh erreicht, so dass hier sehr früh eine erhöhte Transkriptions/Expressionsrate von gewünschten Genen erreicht werden kann.

- 30 Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität können zur Veränderung, also zur Erhöhung oder Reduzierung, oder zur Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp verwendet werden.

- 35 Die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten können zur Veränderung, also zur Erhöhung oder Reduzierung, oder zur Verursachung der Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp verwendet werden.

Ferner können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität und die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten zur Regulation und Verstärkung der Bildung von verschiedenen biosynthetischen Produkten, wie beispielsweise Feinchemikalien, Proteinen, insbesondere Aminosäuren, in Mikroorganismen, insbesondere in *Corynebacterium species* dienen.

Die Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp durch

- 10 a) Veränderung der spezifischen Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen, erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, die die Transkription von endogenen Genen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp oder
- 15 b) Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch Nukleinsäuren mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

Gemäß Ausführungsform a) kann die Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp dadurch erfolgen, dass im Mikroorganismus die spezifische Promotoraktivität verändert, also erhöht oder erniedrigt wird. Dies kann beispielsweise durch gezielte Mutation der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz mit Promotoraktivität, also durch gezielte Substitution, Deletion oder Insertion von Nukleotiden erfolgen. Eine erhöhte bzw. erniedrigte Promotoraktivität kann dadurch erreicht werden, dass Nukleotide in der Bindungsstelle des RNA-Polymerase-Holoenzym-Bindungsstellen (dem Fachmann auch als -10-Region und -35 Region bekannt) ausgetauscht werden. Weiterhin dadurch dass der Abstand der beschriebenen RNA-Polymerase-Holoenzym-Bindungsstellen zueinander durch Deletionen von Nukleotiden oder Insertionen von Nukleotiden verkleinert oder vergrößert werden. Weiterhin dadurch dass Bindungsstellen (dem Fachmann auch als -Operatoren bekannt) für Regulationsproteine (dem Fachmann bekannt als Repressoren und Aktivatoren) in räumliche Nähe an die Bindungsstellen des RNA-Polymerase-Holoenzym gebracht werden, dass diese Regulatoren nach Bindung an eine Promotor-Sequenz die Bindung des und Transkriptionsaktivität des RNA-Polymerase-Holoenzym abschwächen oder verstärken, oder auch unter einen neuen regulatorischen Einfluss stellen.

Die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 44 stellt vorzugsweise die ribosomale Bindungsstelle der erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, die Sequenzen SEQ. ID. NOs. 42 oder 43 die -10-Region der erfindungsgemäßen Expressionseinheiten dar.

Veränderungen der Nukleinsäuresequenz in diesen Regionen führen zu einer Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität.

Die Erfindung betrifft daher die Verwendung der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 44 als ribosomale Bindungsstelle in Expressionseinheiten, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglichen.

Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung der Nukleinsäuresequenzen SEQ. ID. NOs. 42 oder 43 als -10-Region in Expressionseinheiten, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglichen.

Insbesondere betrifft die Erfindung eine Expressionseinheit, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglicht, enthaltend die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 44. Vorzugsweise wird dabei die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 44. als ribosomale Bindungsstelle verwendet .

Weiterhin betrifft die Erfindung eine Expressionseinheit, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglicht, enthaltend mindestens eine der Nukleinsäuresequenzen SEQ. ID. NOs. 42 oder 43. Vorzugsweise wird dabei eine der Nukleinsäuresequenzen SEQ. ID. NOs. 42 oder 43 als -10-Region verwendet.

In Bezug auf die „spezifische Promotoraktivität“ wird unter Erhöhung oder Reduzierung im Vergleich zum Wildtyp eine Erhöhung oder Reduzierung der spezifischen Aktivität gegenüber der erfindungsgemäßen Nukleinsäure mit Promotoraktivität des Wildtyps, also beispielsweise gegenüber der SEQ. ID. NO. 1 verstanden.

Gemäß Ausführungsform b) kann die Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp dadurch erfolgen, dass man die Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch Nukleinsäuren mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

Dies wird bevorzugt dadurch erreicht, dass man

b1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promo-

toraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

5 b2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

10 b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

15 Es ist somit möglich, die Transkriptionsrate eines endogenen Gens des Wildtyps zu verändern, also zu erhöhen oder zu erniedrigen indem man

20 gemäß Ausführungsform b1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

25 gemäß Ausführungsform b2) ein oder mehrere endogene Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten, endogenen Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

30 Gemäß Ausführungsform b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende endogene Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

35 Ferner ist es somit möglich, die Transkriptionsrate eines exogenen Gens im Vergleich zum Wildtyps zu verursachen, indem man

40 gemäß Ausführungsform b2) ein oder mehrere exogene Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten, exogenen Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Pro-

motoraktivität, erfolgt oder

5 Gemäß Ausführungsform b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende exogene Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

10 Die Insertion von Genen gemäß Ausführungsform b2) kann dabei so erfolgen, dass das Gen in kodierende Bereiche oder nicht-kodierende Bereiche integriert wird. Vorzugsweise erfolgt die Insertion in nicht-kodierende Bereiche.

15 Die Insertion von Nukleinsäurekonstrukten gemäß Ausführungsform b3) kann dabei chromosomal oder extrachromosomal erfolgen. Vorzugsweise erfolgt die Insertion der Nukleinsäurekonstrukte chromosomal. Eine „chromosomale“ Integration ist die Insertion eines exogenen DNA-Fragmentes in das Chromosom einer Wirtszelle. Dieser Begriff wird auch für die homologe Rekombination zwischen einem exogenen DNA-Fragment und der entsprechenden Region auf dem Chromosom der Wirtszelle genutzt.

20 In Ausführungsform b) werden bevorzugt auch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) eingesetzt. Diese können in Ausführungsform b), wie in Ausführungsform a) beschrieben im Mikroorganismus vorliegen und hergestellt werden oder in isolierter Form in den Mikroorganismus eingebracht werden.

25 Unter „endogen“ werden genetische Informationen, wie beispielsweise Gene, verstanden, die bereits im Wildtypgenom enthalten sind.

30 Unter „exogen“ werden genetische Informationen, wie beispielsweise Gene, verstanden, die im Wildtypgenom nicht enthalten sind.

35 Unter dem Begriff „Gene“ in Bezug auf Regulation der Transkription durch die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität werden vorzugsweise Nukleinsäuren verstanden, die einen zu transkribierenden Bereich, also beispielsweise einen Bereich der die Translation reguliert, einen kodierenden Bereich, sowie gegebenenfalls weitere Regulationselemente, wie beispielsweise einen Terminator, enthalten.

Unter dem Begriff „Gene“ in Bezug auf die nachstehend beschriebene Regulation der Expression durch die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten werden vorzugsweise Nukleinsäuren verstanden, die einen kodierenden Bereich, sowie gegebenenfalls wei-

tere Regulationselemente, wie beispielsweise einen Terminator, enthalten.

Unter einem „kodierenden Bereich“ wird eine Nukleinsäuresequenz verstanden, die ein Protein kodiert.

5

Unter „heterolog“ in Bezug auf Nukleinsäuren mit Promotoraktivität und Gene wird verstanden, dass die verwendeten Gene im Wildtyp nicht unter Regulation der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität transkribiert werden, sondern dass eine neue, im Wildtyp nicht vorkommende funktionelle Verknüpfung entsteht und die funktionelle Kombination aus erfindungsgemäßer Nukleinsäure mit Promotoraktivität und spezifisches Gen im Wildtyp nicht vorkommt.

10

Unter „heterolog“ in Bezug auf Expressionseinheiten und Gene wird verstanden, dass die verwendeten Gene im Wildtyp nicht unter Regulation der erfindungsgemäßen Expressionseinheiten exprimiert werden, sondern dass eine neue, im Wildtyp nicht vorkommende funktionelle Verknüpfung entsteht und die funktionelle Kombination aus erfindungsgemäßer Expressionseinheit und spezifisches Gen im Wildtyp nicht vorkommt.

15

20 Die Erfindung betrifft ferner in einer bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren zur Erhöhung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp indem man

25

ah) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von erfindungsgemäßen endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, die die Transkription von endogenen Genen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

30

bh) die Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

35

Vorzugsweise wird die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform ah) dadurch erreicht wird, dass man

40

bh1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer en-

dogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten erfindungsgemäßen Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

- 5 bh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen, endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

- 10 bh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

- 15 Die Erfindung betrifft ferner in einer bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren zur Reduzierung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp, indem man

- 20 ar) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, die die Transkription der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp reduziert oder

- 25 br) Nukleinsäuren mit reduzierter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription endogene Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit reduzierter Promotoraktivität erfolgt.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate eines Gens in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp durch

- 30 c) Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität im Mikroorganismus von erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, die die Expression der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp oder
- 35 d) Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c), wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

Gemäß Ausführungsform c) kann die Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp dadurch erfolgen, dass im Mikroorganismus die spezifische Expressionsaktivität verändert, also erhöht oder erniedrigt wird. Dies kann beispielsweise durch gezielte Mutation der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz mit Promotoraktivität, also durch gezielte Substitution, Deletion oder Insertion von Nukleotiden erfolgen. Beispielsweise führt die Verlängerung des Abstandes zwischen Shine-Dalgarno-Sequenz und dem translationellen Startcodon in der Regel zu einer Änderung, einer Verkleinerung oder aber auch einer Verstärkung der spezifischen Expressionsaktivität. Eine Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität kann auch dadurch erreicht werden, dass die Sequenz der Shine-Dalgarno-Region (Ribosomale Bindungsstelle) in seinem Abstand zum translationellen Startcodon durch Deletionen oder Insertionen von Nukleotiden entweder verkürzt oder verlängert wird. Aber auch dadurch dass die Sequenz der Shine-Dalgarno-Region so verändert wird, dass die Homologie zu komplementären 3' Seite 16S rRNA entweder verstärkt oder aber auch verringert wird.

In Bezug auf die „spezifische Expressionsaktivität“ wird unter Erhöhung oder Reduzierung im Vergleich zum Wildtyp eine Erhöhung oder Reduzierung der spezifischen Aktivität gegenüber der erfindungsgemäßen Expressionseinheit des Wildtyps, also beispielsweise gegenüber der SEQ. ID. NO. 2 verstanden.

Gemäß Ausführungsform d) kann die Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp dadurch erfolgen, dass man die Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c) reguliert, wobei die Gene in Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

Dies wird bevorzugt dadurch erreicht, dass man

d1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten erfolgt oder

d2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

5

Es ist somit möglich, die Expressionsrate eines endogenen Gens des Wildtyps zu verändern, also zu erhöhen oder zu erniedrigen indem man

10

gemäß Ausführungsform d1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten erfolgt oder

15

gemäß Ausführungsform d2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

20

gemäß Ausführungsform d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

25

Ferner ist es somit möglich, die Expressionssrate eines exogenen Gens im Vergleich zum Wildtyps zu verursachen, indem man

30

gemäß Ausführungsform d2) ein oder mehrere exogene Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

35

gemäß Ausführungsform d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende, exogene Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

40

Die Insertion von Genen gemäß Ausführungsform d2) kann dabei so erfolgen, dass das Gen in kodierende Bereiche oder nicht-kodierende Bereiche integriert wird. Vorzugsweise erfolgt die Insertion in nicht-kodierende Bereiche.

Die Insertion von Nukleinsäurekonstrukten gemäß Ausführungsform d3) kann dabei chromosomal oder extrachromosomal erfolgen. Vorzugsweise erfolgt die Insertion der Nukleinsäurekonstrukte chromosomal.

- 5 Die Nukleinsäurekonstrukte werden im folgenden auch als Expressionskassetten bezeichnet.

- 10 In Ausführungsform d) werden bevorzugt auch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c) eingesetzt. Diese können in Ausführungsform d), wie in Ausführungsform d) beschrieben im Mikroorganismus vorliegen und hergestellt werden oder in isolierter Form in den Mikroorganismus eingebracht werden.

- 15 Die Erfindung betrifft ferner in einer bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren zur Erhöhung oder Verursachung der Expressionsrate eines Gens in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp indem man

- 20 ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, die die Expression der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

- 25 dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

- 30 Vorzugsweise wird die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c) dadurch erreicht, dass man

- 35 dh1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

- 40 dh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, gegebenen-

falls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

- 5 dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

10 Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Reduzierung der Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp, indem man

- cr) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, die die Expression der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp reduziert oder

- 15 dr) Expressionseinheiten mit reduzierter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform cr) in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression endogener Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten mit reduzierter Expressionsaktivität erfolgt.

- 20 In einer bevorzugten Ausführungsform der vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen sind die Gene ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von Feinchemikalien, wobei die Gene gegebenenfalls weitere Regulationselemente enthalten können.

- 25 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen sind die Gene ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren
- 30 kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Enzymen, wobei die Gene gege-
- 35

benenfalls weitere Regulationselemente enthalten können.

In einer besondere bevorzugten Ausführungsform sind die Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren ausgewählt aus der Gruppe

- 5
- Aspartatkinase, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Decarboxylase, Dihydrodipicolinate-Synthetase, Dihydrodipicolinate-Reduktase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase, Pyruvat-Carboxylase, Triosephosphat-Isomerase, Transkriptioneller Regulator LuxR, Transkriptioneller Regulator LysR1, Transkriptioneller Regulator LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Transketolase, Transaldolase, Homoserin-O-Acetyltransferase, Cystathionin-gamma-Synthase, Cystathionin-beta-Lyase, Serin-Hydroxymethyltransferase, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, Phosphoserin-Aminotransferase, Phosphoserin-Phosphatase, Serin-Acetyl-Transferase, Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin-Kinase, Threonin-Synthase, Threonin-Exporter-Carrier, Threonin-Dehydratase, Pyruvat-Oxidase, Lysin-Exporter, Biotin-Ligase, Cystein-Synthase I, Cystein-Synthase II, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1 und 2, Phosphoadenosin
- 10
- Phosphosulfat Reduktase, Ferredoxin-sulfit-reductase, Ferredoxin NADP Reduktase, 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase, RXA00655 Regulator, RXN2910-Regulator, Arginyl-t-RNA-Synthetase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Threonin Efflux-Protein, Serinhydroxymethyltransferase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein der Sulfat-
- 15
- Reduktion RXA247, Protein OpcA, 1-Phosphofruktokinase und 6-Phosphofruktokinase.

Bevorzugte Proteine und Nukleinsäuren kodierend diese Proteine der vorstehend beschriebenen Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren sind Proteinsequenzen bzw. Nukleinsäuresequenzen mikrobiellen Ursprungs, vorzugsweise aus Bakterien der Gattung Corynebacterium oder Brevibacterium, bevorzugt aus coryneformen Bakterien, besonders bevorzugt aus Corynebacterium glutamicum.

Beispiele für besonders bevorzugte Proteinsequenzen und die entsprechenden Nukleinsäuresequenzen kodierend diese Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren, deren Bezugsdokument, sowie deren Bezeichnung im Bezugsdokument sind in Tabelle 1 aufgelistet:

Tabelle 1

Protein	Nukleinsäure kodierend	Bezugs- dokument	SEQ. ID. NO. im Bezugsdoku-
---------	---------------------------	---------------------	--------------------------------

	Protein		ment
Aspartatkinase	ask oder lysC	EP1108790	DNA: 281 Protein: 3781
Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase	asd	EP1108790	DNA: 331 Protein: 3831
Dihydrodipicolinate-Synthetase	dapA	WO 0100843	DNA: 55 Protein: 56
Dihydrodipicolinate-Reduktase	dapB	WO 0100843	DNA: 35 Protein: 36
Meso-Diaminopimelat-D-Dehydrogenase	ddh	EP1108790	DNA : 3494 Protein : 6944
Diaminopicolinat-Decarboxylase	lysA	EP1108790	DNA: 3451 Prot.:6951
Lysin-Exporter	lysE	EP1108790	DNA: 3455 Prot.: 6955
Arginyl-t-RNA Synthetase	argS	EP1108790	DNA: 3450 Prot.: 6950
Glucose-6-Phosphat-Dehydrognease	zwf	WO 0100844	DNA: 243 Prot.: 244
Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	gap	WO 0100844	DNA: 187 Prot.: 188
3-Phosphoglycerat-kinase	pgk	WO 0100844	DNA: 69 Prot.: 70
Pyruvat-Carboxylase	pycA	EP1108790	DNA: 765 Prot.: 4265
Triosephosphat-Isomerase	tpi	WO 0100844	DNA: 61 Prot.: 62
Biotin-Ligase	birA	EP1108790	DNA: 786 Prot.: 4286
PEP-Carboxylase	pck	EP1108790	DNA: 3470 Prot.: 6970
Homoserin Kinase	thrB	WO 0100843	DNA: 173 Prot.: 174
Threonin Synthase	thrC	WO 0100843	DNA: 175 Prot.: 176
Threonin Export Carrier	thrE	WO 0251231	DNA: 41

			Prot.: 42
Threonin Efflux Protein	RXA2390	WO 0100843	DNA: 7 Prot.: 8
Threonin Dehydratase	ilvA	EP 1108790	DNA: 2328 Prot.: 5828
Homoserin-O-Acetyltransferase	metA	EP 1108790	DNA: 727 Prot.: 4227
Cystathionin-gamma-synthase	metB	EP 1108790	DNA: 3491 Prot.: 6991
Cystathionin-beta-Lyase	metC	EP 1108790	DNA: 2535 Prot.: 6035
Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, -	methH	EP 1108790	DNA: 1663 Prot.: 5163
O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase	metY	EP 1108790	DNA: 726 Prot.: 4226
Methylenetetrahydrofolat-Reduktase	metF	EP 1108790	DNA: 2379 Prot.: 5879
D-3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase	serA	EP 1108790	DNA: 1415 Prot.: 4915
Phosphoserin-Phosphatase 1	serB	WO 0100843	DNA: 153 Prot.: 154
Phosphoserin-Phosphatase 2	serB	EP 1108790	DNA: 467 Prot.: 3967
Phosphoserin-Phosphatase 3	serB	EP 1108790	DNA: 334 Prot.: 3834
Phosphoserin-Aminotransferase	serC	WO 0100843	DNA: 151 Prot.: 152
Serin Acetyl-Transferase	cysE	WO 0100843	DNA: 243 Prot.: 244
Cystein-Synthase I	cysK	EP 1108790	DNA: 2817 Prot.: 6317
Cystein Synthase II	CysM	EP 1108790	DNA: 2338 Prot.: 5838
Homoserin-Dehydrogenase	hom	EP 1108790	DNA: 3452 Prot.: 6952
Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase	metE	WO 0100843	DNA: 755 Prot.: 756

Serin-Hydroxymethyltransferase	glyA	WO 0100843	DNA: 143 Prot.: 144
Protein in Sulfat-Reduktion	RXA247	EP 1108790	DNA: 3089 Prot.: 6589
Protein in Sulfat-Reduktion	RXA248	EP 1108790	DNA: 3090 Prot.: 6590
Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1	CysN	EP 1108790	DNA: 3092 Prot.: 6592
Sulfatadenyltransferase Untereinheit 2	CysD	EP 1108790	DNA: 3093 Prot.: 6593
Phosphoadenosin Phosphosulfat Reduktase	CysH	WO 02729029	DNA: 7 Prot.: 8
Ferredoxin-Sulfit-Reduktase	RXA073	WO 0100842	DNA: 329 Prot.: 330
Ferredoxin NADP Reduktase	RXA076	WO 0100843	DNA: 79 Prot.: 80
Transkriptioneller Regulator LuxR	luxR	WO 0100842	DNA: 297 Protein: 298
Transkriptioneller Regulator LysR1	lysR1	EP 1108790	DNA: 676 Protein: 4176
Transkriptioneller Regulator LysR2	lysR2	EP 1108790	DNA: 3228 Protein: 6728
Transkriptioneller Regulator LysR3	lysR3	EP 1108790	DNA: 2200 Protein: 5700
Malat-Quinon-Oxodoreduktase	mgo	WO 0100844	DNA: 569 Protein: 570
Transketolase	RXA2739	EP 1108790	DNA: 1740 Prot: 5240
Transaldolase	RXA2738	WO 0100844	DNA: 245 Prot: 246
OPCA	opcA	WO 0100804	DNA: 79 Prot: 80
1-Phosphofructokinase 1	pfk1	WO0100844	DNA: 55 Protein: 56
1-Phosphofructokinase 2	pfk2	WO0100844	DNA: 57 Protein: 58
6-Phosphofructokinase 1	6-pfk1	EP 1108790	DNA: 1383 Protein: 4883

6-Phosphofructokinase 2	6-pfk2	DE 10112992	DNA: 1 Protein: 2
Fructose-1,6- bisphosphatase 1	fbr1	EP1108790	DNA: 1136 Protein: 4636
Pyruvat Oxidase	poxB	WO 0100844	DNA : 85 Protein: 86
RXA00655-Regulator	RXA655	US2003162267 .2	DNA: 1 Prot.: 2
RXN02910-Regulator	RXN2910	US2003162267 .2	DNA: 5 Prot.: 6
6- phosphogluconolacto- nase	RXA2735	WO 0100844	DNA: 1 Prot.: 2

5 Ein weiteres Beispiel für eine besonders bevorzugte Proteinsequenz und die entsprechenden Nukleinsäuresequenz kodierend dieses Protein aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren, ist die Sequenz der Fructose-1,6-bisphosphatase 2, oder auch fbr2 genannt, (SEQ. ID. NO. 41) und die entsprechenden Nukleinsäuresequenz kodierend eine Fructose-1,6-bisphosphatase 2 (SEQ. ID. NO. 40).

10 Ein weiteres Beispiel für eine besonders bevorzugte Proteinsequenz und die entsprechenden Nukleinsäuresequenz kodierend dieses Protein aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren, ist die Sequenz des Proteins in Sulfat-Reduktion, oder auch RXA077 genannt, (SEQ. ID. NO. 4) und die entsprechenden Nukleinsäuresequenz kodierend ein Protein in Sulfat-Reduktion (SEQ. ID. NO. 3)

15 Weitere besonders bevorzugte Proteinsequenzen aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren, weisen jeweils die in Tabelle 1 für dieses Protein angegebene Aminosäuresequenz auf, wobei das jeweilige Protein jeweils an mindestens einer der in Tabelle 2/Spalte2 für diese Aminosäuresequenz angegebenen Aminosäurepositionen eine andere proteinogene Aminosäure aufweist als die jeweilige in Tabelle2/Spalte3 in der gleichen Zeile angegebene Aminosäure. In einer weiter bevorzugten Ausführungsform,
20 weisen die Proteine an mindestens einer der in Tabelle 2/Spalte 2 für die Aminosäuresequenz angegebenen Aminosäureposition die in Tabelle2/Spalte4 in der gleichen Zeile angegebene Aminosäure auf. Es handelt sich bei den in Tabelle 2 angegebenen Proteine um mutierte Proteine des Biosyntheseweges von Aminosäuren, die besonders vorteilhafte Eigenschaften aufweisen und sich deshalb insbesondere zur Expres-
25 sion der entsprechenden Nukleinsäuren durch den erfindungsgemäßen Promotor und zur Herstellung von Aminosäuren eignen. Beispielsweise führt die Mutation T311I zu

einem Ausschalten der feedback-Inhibierung von ask.

Die entsprechenden Nukleinsäuren, die ein vorstehend beschriebenes mutiertes Protein aus Tabelle 2 kodieren, lassen sich durch übliche verfahren herstellen.

5

Als Ausgangspunkt zur Herstellung der Nukleinsäuresequenzen kodierend ein mutiertes Protein eignet sich beispielsweise das Genom eines *Corynebacterium glutamicum*-Stammes, der von der American Type Culture Collection unter der Bezeichnung ATCC 13032 erhältlich ist oder die in Tabelle 1 in Bezug genommenen Nukleinsäuresequenzen.

10

Für die Rückübersetzung der Aminosäuresequenz der mutierten Proteine in die Nukleinsäuresequenzen kodierend diese Proteine ist es vorteilhaft, die codon usage desjenigen Organismus zu verwenden, in den die Nukleinsäuresequenz eingebracht werden soll oder in der die Nukleinsäuresequenz vorliegt. Beispielsweise ist es vorteilhaft für *Corynebacterium glutamicum* die codon usage von *Corynebacterium glutamicum* zu verwenden. Die codon usage des jeweiligen Organismus lässt sich in an sich bekannter Weise aus Datenbanken oder Patentanmeldungen ermitteln, die zumindest ein Protein und ein Gen, das dieses Protein kodiert, aus dem gewünschten Organismus beschreiben.

15

20 Die Angaben in Tabelle 2 sind folgendermassen zu verstehen:

In Spalte 1 "Identifikation" wird eine eindeutige Bezeichnung für jede Sequenz in Bezug auf Tabelle 1 aufgeführt.

25

In Spalte 2 "AS-POS" bezieht sich die jeweilige Zahl auf die Aminosäureposition der entsprechenden Polypeptidsequenz aus Tabelle 1. Eine "26" in der Spalte "AS-POS" bedeutet demzufolge die Aminosäureposition 26 der entsprechend angegebenen Polypeptidsequenz. Die Zählung der Position beginnt N-Terminal bei +1.

30

In Spalte 3 "AS-Wildtyp" bezeichnet der jeweilige Buchstabe die Aminosäure – dargestellt im Ein-Buchstaben-Code- an der in Spalte 2 angegebenen Position beim entsprechenden Wildtyp-Stamm der Sequenz aus Tabelle 1.

35

In Spalte 4 "AS-Mutante" bezeichnet der jeweilige Buchstabe die Aminosäure – dargestellt im Ein-Buchstaben-Code- an der in Spalte 2 angegebenen Position beim entsprechenden Mutanten-Stamm.

In Spalte 5 "Funktion" wird die physiologische Funktion der entsprechenden Polypeptidsequenz aufgeführt.

40

Für ein mutiertes Protein mit einer bestimmten Funktion (Spalte 5) und einer bestimmten Ausgangsaminosäuresequenz (Tabelle 1) werden in den Spalten 2,3 und 4 mindestens eine Mutation, bei einigen Sequenzen auch mehrere Mutationen beschrieben. Diese mehreren Mutationen beziehen sich immer auf die jeweils obenstehende, nächstliegende Ausgangsaminosäuresequenz (Tabelle 1). Unter dem Begriff „mindestens eine der Aminosäurepositionen“ einer bestimmten Aminosäuresequenz wird vorzugsweise mindestens eine der für diese Aminosäuresequenz in Spalte 2, 3 und 4 beschriebenen Mutationen verstanden.

5 10 Ein-Buchstaben-Code der proteinogenen Aminosäuren:

- A Alanin
- C Cystein
- D Aspartat
- 15 E Glutamat
- F Phenylalanin
- G Glycin
- H His
- I Isoleucin
- 20 K Lysin
- L Leucin
- M Methionin
- N Asparagin
- P Prolin
- 25 Q Glutamin
- R Arginin
- S Serin
- T Threonin
- V Valin
- 30 W Tryptophan
- Y Tyrosin

Tabelle 2

Spalte 1	Spalte 2	Spalte 3	Spalte 4	Spalte 5
Identifikation	AS Position	AS Wildtyp	AS Mutante	Funktion
ask	317	S	A	Aspartatkinase
	311	T	I	
	279	A	T	

35

asd	66	D	G	Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase
	234	R	H	
	272	D	E	
	285	K	E	
	20	L	F	
dapA	2	S	A	Dihydrodipicolinat Synthetase
	84	K	N	
	85	L	V	
dapB	91	D	A	Dihydrodipicolinat-Reduktase
	83	D	N	
ddh	174	D	E	Meso-Diaminopimelat-D-Dehydrogenase
	235	F	L	
	237	S	A	
lysA	265	A	D	Diaminopicolinat-Decarboxylase
	320	D	N	
	332	I	V	
argS	355	G	D	Arginyl-t-RNA-Synthetase
	156	A	S	
	513	V	A	
	540	H	R	
zwf	8	S	T	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
	150	T	A	
	321	G	S	
gap	264	G	S	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
pycA	7	S	L	Pyruvat-Carboxylase
	153	E	D	
	182	A	S	
	206	A	S	
	227	H	R	
	455	A	G	
	458	P	S	
	639	S	T	
	1008	R	H	
	1059	S	P	

	1120	D	E	
pck	162	H	Y	PEP-Carboxylase
	241	G	D	
	829	T	R	
thrB	103	S	A	Homoserin Kinase
	190	T	A	
	133	A	V	
	138	P	S	
thrC	69	G	R	Threonin Synthase
	478	T	I	
RXA330	85	I	M	Threonin-Efflux Protein
	161	F	I	
	195	G	D	
hom	104	V	I	Homoserin-Dehydrogenase
	116	T	I	
	148	G	A	
	59	V	A	
	270	T	S	
	345	R	P	
	268	K	N	
	61	D	H	
	72	E	Q	
lysR1	80	R	H	transkriptioneller Regulator LysR1
lysR3	142	R	W	transkriptioneller Regulator LysR3
	179	A	T	
RXA2739	75	N	D	Transketolase
	329	A	T	
	332	A	T	
	556	V	I	
RXA2738	242	K	M	Transaldolase
opcA	107	Y	H	OpcA
	219	K	N	
	233	P	S	
	261	Y	H	
	312	S	F	
	65	G	R	Aspartat-1-Decarboxylase
	33	G	S	6- Phosphogluconolactonase

In den vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen sowie den nachstehend beschriebenen Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Mikroorganismen, den nachstehend beschriebenen genetisch veränderten Mikroorganismen und den nachstehend beschriebenen Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten erfolgt das Einbringen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, der erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, der vorstehend beschriebenen Gene und der vorstehend beschriebenen Nukleinsäurekonstrukte oder Expressionskassetten in den Mikroorganismus, insbesondere in coryneforme Bakterien, vorzugsweise durch die SacB-Methode.

Die SacB-Methode ist dem Fachmann bekannt und beispielsweise in Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A.; Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the Escherichia coli plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of Corynebacterium glutamicum, Gene. 1994 Jul 22;145(1):69-73 und Blomfield IC, Vaughn V, Rest RF, Eisenstein BI.; Allelic exchange in Escherichia coli using the Bacillus subtilis sacB gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon; Mol Microbiol. 1991 Jun;5(6):1447-57 beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren erfolgt die Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen durch Einbringen von erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität bzw. erfindungsgemäßen Expressionseinheiten in den Mikroorganismus.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren erfolgt die Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen durch Einbringen der vorstehend beschriebenen Nukleinsäurekonstrukte oder Expressionskassetten in den Mikroorganismus.

Die Erfindung betrifft daher ferner eine Expressionskassette, umfassend mindestens eine erfindungsgemäße Expressionseinheit

mindestens eine weitere, zu exprimierende Nukleinsäuresequenz, also ein zu exprimierendes Gen und

gegebenenfalls weitere genetische Kontrollelemente, wie beispielsweise einen Terminator,

- 5 wobei mindestens eine Expressionseinheit und eine weitere, zu exprimierende, Nukleinsäuresequenz funktionell miteinander verknüpft sind und die weitere, zu exprimierende, Nukleinsäuresequenz in Bezug auf die Expressionseinheit heterolog ist.

Vorzugsweise ist die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz mindestens eine Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von Feinchemikalien.

10

- Besonders bevorzugt ist die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Enzymen.

20

- Bevorzugte Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren sind vorstehend und deren Beispiele in Tabelle 1 und 2 beschrieben.

25

- In den erfindungsgemäßen Expressionskassetten ist die physikalische Lage der Expressionseinheit relativ zum zu exprimierenden Gen so gewählt, daß die Expressionseinheit die Transkription und vorzugsweise auch die Translation des zu exprimierenden Gens reguliert und damit die Bildung eines oder mehrerer Proteine ermöglicht. Die "Bildung ermöglichen" beinhaltet dabei die konstitutive Steigerung der Bildung, Abschwächung bzw. Blockierung der Bildung unter spezifischen Bedingungen und oder die Steigerung der Bildung unter spezifischen Bedingungen. Die "Bedingungen" umfassen dabei: (1) Zugabe einer Komponente zum Kulturmedium, (2) Entfernen einer Komponente vom Kulturmedium, (3) Austausch einer Komponente im Kulturmedium durch eine zweite Komponente, (4) Erhöhung der Temperatur des Kulturmediums, (5) Erniedrigung der Temperatur des Kulturmediums, und (6) Regulierung der atmosphärischen Bedingungen, wie z.B. die Sauerstoff- oder Stickstoffkonzentration, in der das Kulturmedium gehalten wird.

40

Die Erfindung betrifft ferner einen Expressionsvektor enthaltend eine vorstehend beschriebene, erfindungsgemäße Expressionskassette.

5 Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert
10 werden.

Als Plasmide eignen sich solche besonders bevorzugt, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren, wie z. B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102: 93-98 (1991)) oder pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107: 69-74 (1991))
15 beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren, wie z. B. pCLiK5MCS, oder solche, die auf pCG4 (US-A 4,489,160) oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)) oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.

20 Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Remscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60,126-132 (1994)) zur Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons beschrieben
25 wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise E. coli), nicht aber in C. glutamicum replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Sirnon et al., Bio/ Technology 1,784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145,69-73 (1994)), Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al. 1991, Journal of Bacteriology 173: 4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Transformation in den gewünschten Stamm von C. glutamicum überführt. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio-
30 technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123,343-347 (1994)) beschrieben.

Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch verändertern Mikroorganismus, wobei die genetische Veränderung zu einer Veränderung oder Verursachung der Transkriptions-

rate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp führt und bedingt ist durch

- 5 a) Veränderung der spezifischen Promotoraktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription mindestens eines endogenen Gens reguliert oder
- 10 b) Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.
- 15 Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht, dass man
- 20 b1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder
- 25 b2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder
- 30 b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.
- 35 Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus mit erhöhter oder verursachter Transkriptionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, wobei
- 40 ah) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von endogenen Ge-

nen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist oder

- 5 bh) die Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform ah) reguliert wird, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

- 10 Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht, dass man

- 15 bh1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

- 20 bh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

- 25 bh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

- 30 Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus mit reduzierter Transkriptionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, wobei

- 35 ar) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von mindestens einem, endogenen Gen reguliert, im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist oder

- 40 br) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit reduzierter Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) in das Genom des Mikroorganismus eingebracht wurden, so dass die Transkription mindestens eines endogenen Gens unter der Kontrolle der eingebrachten

Nukleinsäure mit reduzierter Promotoraktivität erfolgt.

Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus, wobei die genetische Veränderung zu einer Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp führt und bedingt ist durch

c) Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression mindestens eines endogenen Gens reguliert, im Vergleich zum Wildtyp oder

d) Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht, dass man

d1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

d2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus mit erhöhter oder verursachter Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp, wobei man

ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression der endogenen Gene reguliert, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

- 5 dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

- 10 Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht, dass man

- 15 dh1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

20

dh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

25

dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

30

Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus mit reduzierter Expressionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, wobei,

- 35 cr) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression von mindestens einem endogenen Gen reguliert, im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist oder

- 40 dr) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit reduzierter Expressionsaktivität in das Genom des Mikroorganismus eingebracht wurden, so dass die Expression mindestens eines Gens unter der Kontrolle der eingebrachten Expres-

sionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3 mit reduzierter Expressionsaktivität erfolgt.

- 5 Ferner betrifft die Erfindung einen genetisch veränderter Mikroorganismus, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3 und funktionell verknüpft ein zu eprimierendes Gen, wobei das Gen im Bezug auf die Expressionseinheit heterolog ist.

10 Besonders bevorzugt enthält dieser genetisch veränderte Mikroorganismus eine erfindungsgemäße Expressionskasette.

15 Besonders bevorzugt betrifft die vorliegende Erfindung genetisch veränderte Mikroorganismen, insbesondere coryneforme Bakterien, die einen Vektor, insbesondere Pendelvektor oder Plasmidvektor, der wenigstens ein rekombinantes Nukleinsäurekonstrukt erfindungsgemäßer Definition trägt, enthalten.

20 In einer bevorzugten Ausführungsform der genetisch veränderten Mikroorganismen sind die vorstehend beschriebenen Gene mindestens eine Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von Feinchemikalien.

25 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der genetisch veränderten Mikroorganismen sind die vorstehend beschriebenen Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Enzymen, wobei die Gene gegebenenfalls weitere Regulationselemente enthalten können.

35 Bevorzugte Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren sind ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Decarboxylase, Dihydrodipicolinate-Synthetase, Dihydrodipicolinate-Reduktase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-
40 Phosphoglycerat-Kinase, Pyruvat-Carboxylase, Triosephosphat-Isomerase, Transkrip-

tioneller Regulator LuxR, Transkriptioneller Regulator LysR1, Transkriptioneller Regulator LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Transketolase, Transaldolase, Homoserin-O-Acetyltransferase, Cystathionin-gamma-Synthase, Cystathionin-beta-Lyase, Serin-Hydroxymethyltransferase, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, Phosphoserin-Aminotransferase, Phosphoserin-Phosphatase, Serin-Acetyl-Transferase, Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin-Kinase, Threonin-Synthase, Threonin-Exporter-Carrier, Threonin-Dehydratase, Pyruvat-Oxidase, Lysin-Exporter, Biotin-Ligase, Cystein-Synthase I, Cystein-Synthase II

5

10 Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1 und 2, Phosphoadenosin Phosphosulfat Reduktase, Ferredoxin-sulfit-reductase, Ferredoxin NADP Reduktase, 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase, RXA00655 Regulator, RXN2910-Regulator, Arginyl-t-RNA-Synthetase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Threonin Efflux-Protein, Serinhydroxymethyltransferase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein der Sulfat-Reduktion RXA247, Protein OpcA, 1-Phosphofruktokinase und 6-Phosphofruktokinase

15

Besonders bevorzugte Beispiele der Proteine und Gene aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren sind vorstehend in Tabelle 1 und Tabelle 2 beschrieben.

20

Bevorzugte Mikroorganismen oder genetisch veränderte Mikroorganismen sind Bakterien, Algen, Pilze oder Hefen.

25 Besonders bevorzugte Mikroorganismen sind insbesondere coryneforme Bakterien.

Bevorzugte coryneforme Bakterien sind Bakterien der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Arten *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium acetoglutamicum*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Corynebacterium melassecola* und *Corynebacterium efficiens* oder der Gattung *Brevibacterium*, insbesondere der Arten *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum* und *Brevibacterium divaricatum*.

30

Besonders bevorzugte Bakterien der Gattungen *Corynebacterium* und *Brevibacterium* sind ausgewählt aus der Gruppe *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC 15806, *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC 13870, *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539, *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965, *Corynebacterium efficiens* DSM 44547, *Corynebacterium efficiens* DSM 44548, *Corynebacterium efficiens* DSM 44549, *Brevibacterium flavum*

35

40 ATCC 14067, *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869, *Brevibacterium divarica-*

tum ATCC 14020, Corynebacterium glutamicum KFCC10065 und Corynebacterium glutamicum ATCC21608.

- 5 Mit der Abkürzung KFCC ist die Korean Federation of Culture Collection gemeint, mit der Abkürzung ATCC die American type strain culture collection, mit der Abkürzung DSM die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen.

Weitere besonders bevorzugte Bakterien der Gattungen Corynebacterium und Brevibacterium sind in Tabelle 3 aufgelistet:

10

Bakterium		Hinterlegungsnummer							
Genus	species	ATCC	FERM	NRRL	CECT	NCIMB	CBS	NCTC	DSMZ
Brevibacterium	ammoniagenes	21054							
Brevibacterium	ammoniagenes	19350							
Brevibacterium	ammoniagenes	19351							
Brevibacterium	ammoniagenes	19352							
Brevibacterium	ammoniagenes	19353							
Brevibacterium	ammoniagenes	19354							
Brevibacterium	ammoniagenes	19355							
Brevibacterium	ammoniagenes	19356							
Brevibacterium	ammoniagenes	21055							
Brevibacterium	ammoniagenes	21077							
Brevibacterium	ammoniagenes	21553							
Brevibacterium	ammoniagenes	21580							
Brevibacterium	ammoniagenes	39101							
Brevibacterium	butanicum	21196							
Brevibacterium	divaricatum	21792	P928						
Brevibacterium	flavum	21474							
Brevibacterium	flavum	21129							
Brevibacterium	flavum	21518							
Brevibacterium	flavum			B11474					
Brevibacterium	flavum			B11472					
Brevibacterium	flavum	21127							
Brevibacterium	flavum	21128							
Brevibacterium	flavum	21427							
Brevibacterium	flavum	21475							
Brevibacterium	flavum	21517							
Brevibacterium	flavum	21528							
Brevibacterium	flavum	21529							
Brevibacterium	flavum			B11477					
Brevibacterium	flavum			B11478					
Brevibacterium	flavum	21127							

Brevibacterium	flavum			B11474					
Brevibacterium	healii	15527							
Brevibacterium	ketoglutamicum	21004							
Brevibacterium	ketoglutamicum	21089							
Brevibacterium	ketosoreductum	21914							
Brevibacterium	lactofermentum				70				
Brevibacterium	lactofermentum				74				
Brevibacterium	lactofermentum				77				
Brevibacterium	lactofermentum	21798							
Brevibacterium	lactofermentum	21799							
Brevibacterium	lactofermentum	21800							
Brevibacterium	lactofermentum	21801							
Brevibacterium	lactofermentum			B11470					
Brevibacterium	lactofermentum			B11471					
Brevibacterium	lactofermentum	21086							
Brevibacterium	lactofermentum	21420							
Brevibacterium	lactofermentum	21086							
Brevibacterium	lactofermentum	31269							
Brevibacterium	linens	9174							
Brevibacterium	linens	19391							
Brevibacterium	linens	8377							
Brevibacterium	paraffinolyticum					11160			
Brevibacterium	spec.						717.73		
Brevibacterium	spec.						717.73		
Brevibacterium	spec.	14604							
Brevibacterium	spec.	21860							
Brevibacterium	spec.	21864							
Brevibacterium	spec.	21865							
Brevibacterium	spec.	21866							
Brevibacterium	spec.	19240							
Corynebacterium	acetoacidophilum	21476							
Corynebacterium	acetoacidophilum	13870							
Corynebacterium	acetoglutamicum			B11473					
Corynebacterium	acetoglutamicum			B11475					
Corynebacterium	acetoglutamicum	15806							
Corynebacterium	acetoglutamicum	21491							
Corynebacterium	acetoglutamicum	31270							
Corynebacterium	acetophilum			B3671					
Corynebacterium	ammoniagenes	6872						2399	
Corynebacterium	ammoniagenes	15511							
Corynebacterium	fujiokense	21496							
Corynebacterium	glutamicum	14067							

Corynebacterium	glutamicum	39137							
Corynebacterium	glutamicum	21254							
Corynebacterium	glutamicum	21255							
Corynebacterium	glutamicum	31830							
Corynebacterium	glutamicum	13032							
Corynebacterium	glutamicum	14305							
Corynebacterium	glutamicum	15455							
Corynebacterium	glutamicum	13058							
Corynebacterium	glutamicum	13059							
Corynebacterium	glutamicum	13060							
Corynebacterium	glutamicum	21492							
Corynebacterium	glutamicum	21513							
Corynebacterium	glutamicum	21526							
Corynebacterium	glutamicum	21543							
Corynebacterium	glutamicum	13287							
Corynebacterium	glutamicum	21851							
Corynebacterium	glutamicum	21253							
Corynebacterium	glutamicum	21514							
Corynebacterium	glutamicum	21516							
Corynebacterium	glutamicum	21299							
Corynebacterium	glutamicum	21300							
Corynebacterium	glutamicum	39684							
Corynebacterium	glutamicum	21488							
Corynebacterium	glutamicum	21649							
Corynebacterium	glutamicum	21650							
Corynebacterium	glutamicum	19223							
Corynebacterium	glutamicum	13869							
Corynebacterium	glutamicum	21157							
Corynebacterium	glutamicum	21158							
Corynebacterium	glutamicum	21159							
Corynebacterium	glutamicum	21355							
Corynebacterium	glutamicum	31808							
Corynebacterium	glutamicum	21674							
Corynebacterium	glutamicum	21562							
Corynebacterium	glutamicum	21563							
Corynebacterium	glutamicum	21564							
Corynebacterium	glutamicum	21565							
Corynebacterium	glutamicum	21566							
Corynebacterium	glutamicum	21567							
Corynebacterium	glutamicum	21568							
Corynebacterium	glutamicum	21569							
Corynebacterium	glutamicum	21570							

Corynebacterium	glutamicum	21571							
Corynebacterium	glutamicum	21572							
Corynebacterium	glutamicum	21573							
Corynebacterium	glutamicum	21579							
Corynebacterium	glutamicum	19049							
Corynebacterium	glutamicum	19050							
Corynebacterium	glutamicum	19051							
Corynebacterium	glutamicum	19052							
Corynebacterium	glutamicum	19053							
Corynebacterium	glutamicum	19054							
Corynebacterium	glutamicum	19055							
Corynebacterium	glutamicum	19056							
Corynebacterium	glutamicum	19057							
Corynebacterium	glutamicum	19058							
Corynebacterium	glutamicum	19059							
Corynebacterium	glutamicum	19060							
Corynebacterium	glutamicum	19185							
Corynebacterium	glutamicum	13286							
Corynebacterium	glutamicum	21515							
Corynebacterium	glutamicum	21527							
Corynebacterium	glutamicum	21544							
Corynebacterium	glutamicum	21492							
Corynebacterium	glutamicum			B8183					
Corynebacterium	glutamicum			B8182					
Corynebacterium	glutamicum			B12416					
Corynebacterium	glutamicum			B12417					
Corynebacterium	glutamicum			B12418					
Corynebacterium	glutamicum			B11476					
Corynebacterium	glutamicum	21608							
Corynebacterium	lilium		P973						
Corynebacterium	nitrilophilus	21419				11594			
Corynebacterium	spec.		P4445						
Corynebacterium	spec.		P4446						
Corynebacterium	spec.	31088							
Corynebacterium	spec.	31089							
Corynebacterium	spec.	31090							
Corynebacterium	spec.	31090							
Corynebacterium	spec.	31090							
Corynebacterium	spec.	15954							20145
Corynebacterium	spec.	21857							
Corynebacterium	spec.	21862							
Corynebacterium	spec.	21863							

Die Abkürzungen haben folgende Bedeutung:

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA

5 FERM: Fermentation Research Institute, Chiba, Japan

NRRL: ARS Culture Collection, Northern Regional Research Laboratory, Peoria, IL, USA

CECT: Coleccion Espanola de Cultivos Tipo, Valencia, Spain

NCIMB: National Collection of Industrial and Marine Bacteria Ltd., Aberdeen, UK

10 CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, NL

NCTC: National Collection of Type Cultures, London, UK

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany

15 Durch die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität und den erfindungsgemäßen Expressionseinheiten ist es mit Hilfe der vorstehend beschriebenen, erfindungsgemäßen Verfahren möglich in den vorstehend beschriebenen, erfindungsgemäßen genetisch veränderten Mikroorganismen die Stoffwechselwege zu spezifischen biosynthetischen Produkten zu regulieren.

20 Dazu werden beispielsweise Stoffwechselwege die zu einem spezifischen biosynthetischen Produkt führen durch Verursachung oder Erhöhung der Transkriptionrate bzw. Expressionsrate von Genen dieses Biosyntheseweges verstärkt in dem die erhöhte Proteinmenge zu einer erhöhten Gesamtaktivität dieser Proteine des gewünschten Biosyntheseweges und damit zu einem verstärkten Stoffwechselfluß zu dem gewünschten biosynthetischen Produkt führt.

30 Weiterhin können Stoffwechselwege die von einem spezifischen biosynthetischen Produkt wegführen durch Reduzierung der Transkriptionrate bzw. Expressionsrate von Genen dieses wegführenden Biosyntheseweges abgeschwächt werden in dem die reduzierte Proteinmenge zu einer reduzierten Gesamtaktivität dieser Proteine des unerwünschten Biosyntheseweges und damit zusätzlich zu einem verstärkten Stoffwechselfluß zu dem gewünschten biosynthetischen Produkt führt.

35 Die erfindungsgemäßen genetisch veränderten Mikroorganismen sind beispielsweise in der Lage aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol biosynthetische Produkte herzustellen.

40 Die Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten durch Kultivierung von erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Mikroorganis-

men.

- Je nach gewünschtem biosynthetischen Produkt muss die Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate verschiedener Gene erhöht bzw. reduziert werden. In der Regel ist es vorteilhaft die Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate mehrere Gene zu verändern, d.h. die Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate einer Kombination von Gene zu Erhöhen und/oder die Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate einer Kombination von Gene zu reduzieren.
- 10 In den erfindungsgemäßen genetisch veränderten Mikroorganismen ist mindestens eine veränderte, dass heißt erhöhte oder reduzierte Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate eines Gens auf eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität bzw. erfindungsgemäße Expressionseinheit zurückzuführen.
- 15 Weitere, zusätzliche veränderte, d.h. zusätzlich erhöhte oder zusätzlich reduzierte Transkriptionsraten bzw. Expressionsraten von weiteren Genen im genetisch veränderten Mikroorganismus können, müssen aber nicht auf die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität bzw. die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten zurück gehen.
- 20 Die Erfindung betrifft deshalb weiterhin ein Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten durch Kultivierung von erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Mikroorganismen.
- 25 Bevorzugte biosynthetische Produkte sind Feinchemikalien.
- 30 Der Begriff "Feinchemikalie" ist im Fachgebiet bekannt und beinhaltet Verbindungen, die von einem Organismus produziert werden und in verschiedenen Industriezweigen Anwendungen finden, wie bspw., jedoch nicht beschränkt auf die pharmazeutische Industrie, die Landwirtschafts-, Kosmetik, Food und Feed-Industrie. Diese Verbindungen umfassen organische Säuren, wie beispielsweise Weinsäure, Itaconsäure und Diaminopimelinsäure, sowohl proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, Purin- und Pyrimidinbasen, Nukleoside und Nukleotide (wie bspw. beschrieben in Kuninaka, A. (1996) Nucleotides and related compounds, S. 561-612, in Biotechnology
- 35 Bd. 6, Rehm et al., Hrsg. VCH: Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten), Lipide, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren (bspw. Arachidonsäure), Diöle (bspw. Propan-1,2-diol und Butandiol), Kohlenhydrate (bspw. Hyaluronsäure und Trehalose), aromatische Verbindungen (bspw. aromatische Amine, Vanillin und Indigo), Vitamine und Cofaktoren (wie beschrieben in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A27,
- 40 "Vitamins", S. 443-613 (1996) VCH: Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten; und

- 5 Ong, A.S., Niki, E. und Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research - Asien, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCS Press (1995)), Enzyme und sämtliche anderen von Gutcho (1983) in Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086 und den darin angegebenen Literaturstellen, beschriebenen Chemikalien. Der Metabolismus und die Verwendungen bestimmter Feinchemikalien sind nachstehend weiter erläutert.

10 I. Aminosäure-Metabolismus und Verwendungen

- 15 Die Aminosäuren umfassen die grundlegenden Struktureinheiten sämtlicher Proteine und sind somit für die normalen Zellfunktionen essentiell. Der Begriff "Aminosäure" ist im Fachgebiet bekannt. Die proteinogenen Aminosäuren, von denen es 20 Arten gibt, dienen als Struktureinheiten für Proteine, in denen sie über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind, wohingegen die nicht-proteinogenen Aminosäuren (von denen Hunderte bekannt sind) gewöhnlich nicht in Proteinen vorkommen (siehe Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 57-97 VCH: Weinheim (1985)). Die Aminosäuren können in der D- oder L-Konfiguration vorliegen, obwohl L-Aminosäuren
- 20 gewöhnlich der einzige Typ sind, den man in natürlich vorkommenden Proteinen vorfindet. Biosynthese- und Abbauwege von jeder der 20 proteinogenen Aminosäuren sind sowohl bei prokaryotischen als auch eukaryotischen Zellen gut charakterisiert (siehe bspw. Stryer, L. Biochemistry, 3. Auflage, S. 578-590 (1988)). Die "essentiellen" Aminosäuren (Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Threonin,
- 25 Tryptophan und Valin), so bezeichnet, da sie aufgrund der Komplexität ihrer Biosynthese mit der Ernährung aufgenommen werden müssen, werden durch einfache Biosynthesewege in die übrigen 11 "nichtessentiellen" Aminosäuren (Alanin, Arginin, Asparagin, Aspartat, Cystein, Glutamat, Glutamin, Glycin, Prolin, Serin und Tyrosin) umgewandelt. Höhere Tiere besitzen die Fähigkeit, einige dieser Aminosäuren zu synthetisieren, jedoch müssen die essentiellen Aminosäuren mit der Nahrung aufgenommen werden, damit eine normale Proteinsynthese stattfindet.
- 30

- 35 Abgesehen von ihrer Funktion bei der Proteinbiosynthese sind diese Aminosäuren interessante Chemikalien an sich, und man hat entdeckt, daß viele bei verschiedenen Anwendungen in der Nahrungsmittel-, Futter-, Chemie-, Kosmetik-, Landwirtschafts- und pharmazeutischen Industrie zum Einsatz kommen. Lysin ist nicht nur für die Ernährung des Menschen eine wichtige Aminosäure, sondern auch für monogastrische Tiere, wie Geflügel und Schweine. Glutamat wird am häufigsten als Geschmacksadditiv (Mononatriumglutamat, MSG) sowie weithin in der Nahrungsmittelindustrie verwendet, wie
- 40 auch Aspartat, Phenylalanin, Glycin und Cystein. Glycin, L-Methionin und Tryptophan

werden sämtlich in der pharmazeutischen Industrie verwendet. Glutamin, Valin, Leucin, Isoleucin, Histidin, Arginin, Prolin, Serin und Alanin werden in der pharmazeutischen Industrie und der Kosmetikindustrie verwendet. Threonin, Tryptophan und D-/L-Methionin sind weitverbreitete Futtermittelzusätze (Leuchtenberger, W. (1996) Amino acids - technical production and use, S. 466-502 in Rehm et al., (Hrsg.) Biotechnology Bd. 6, Kapitel 14a, VCH: Weinheim). Man hat entdeckt, daß sich diese Aminosäuren außerdem als Vorstufen für die Synthese von synthetischen Aminosäuren und Proteinen, wie N-Acetylcystein, S-Carboxymethyl-L-cystein, (S)-5-Hydroxytryptophan und anderen, in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 57-97, VCH, Weinheim, 1985 beschriebenen Substanzen eignen.

Die Biosynthese dieser natürlichen Aminosäuren in Organismen, die sie produzieren können, bspw. Bakterien, ist gut charakterisiert worden (für einen Überblick der bakteriellen Aminosäure-Biosynthese und ihrer Regulation, s. Umbarger, H.E. (1978) Ann. Rev. Biochem. 47: 533 - 606). Glutamat wird durch reduktive Aminierung von α -Ketoglutarat, einem Zwischenprodukt im Citronensäure-Zyklus, synthetisiert. Glutamin, Prolin und Arginin werden jeweils nacheinander aus Glutamat erzeugt. Die Biosynthese von Serin erfolgt in einem Dreischritt-Verfahren und beginnt mit 3-Phosphoglycerat (einem Zwischenprodukt bei der Glykolyse), und ergibt nach Oxidations-, Transaminierungs- und Hydrolyseschritten diese Aminosäure. Cystein und Glycin werden jeweils aus Serin produziert, und zwar die erstere durch Kondensation von Homocystein mit Serin, und die letztere durch Übertragung des Seitenketten- β -Kohlenstoffatoms auf Tetrahydrofolat, in einer durch Serintranshydroxymethylase katalysierten Reaktion. Phenylalanin und Tyrosin werden aus den Vorstufen des Glycolyse- und Pento- sephosphatweges, Erythrose-4-phosphat und Phosphoenolpyruvat in einem 9-Schritt-Biosyntheseweg synthetisiert, der sich nur in den letzten beiden Schritten nach der Synthese von Prephenat unterscheidet. Tryptophan wird ebenfalls aus diesen beiden Ausgangsmolekülen produziert, jedoch erfolgt dessen Synthese in einem 11-Schritt-Weg. Tyrosin läßt sich in einer durch Phenylalaninhydroxylase katalysierten Reaktion auch aus Phenylalanin herstellen. Alanin, Valin und Leucin sind jeweils Biosyntheseprodukte aus Pyruvat, dem Endprodukt der Glykolyse. Aspartat wird aus Oxalacetat, einem Zwischenprodukt des Citratzyklus, gebildet. Asparagin, Methionin, Threonin und Lysin werden jeweils durch Umwandlung von Aspartat produziert. Isoleucin wird aus Threonin gebildet. In einem komplexen 9-Schritt-Weg erfolgt die Bildung von Histidin aus 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat, einem aktivierten Zucker.

Aminosäuren, deren Menge den Proteinbiosynthesebedarf der Zelle übersteigt, können nicht gespeichert werden, und werden stattdessen abgebaut, so daß Zwischenprodukte für die Haupt-Stoffwechselwege der Zelle bereitgestellt werden (für einen Überblick siehe Stryer, L., Biochemistry, 3. Aufl. Kap. 21 "Amino Acid Degradation and the Urea

- Cycle"; S 495-516 (1988)). Die Zelle ist zwar in der Lage, ungewünschte Aminosäuren in nützliche Stoffwechsel-Zwischenprodukte umzuwandeln, jedoch ist die Aminosäureproduktion hinsichtlich der Energie, der Vorstufenmoleküle und der für ihre Synthese nötigen Enzyme aufwendig. Es überrascht daher nicht, daß die Aminosäure-
- 5 Biosynthese durch Feedback-Hemmung reguliert wird, wobei das Vorliegen einer bestimmten Aminosäure ihre eigene Produktion verlangsamt oder ganz beendet (für einen Überblick über den Rückkopplungs-Mechanismus bei Aminosäure-
- Biosynthesewegen, siehe Stryer, L., Biochemistry, 3. Aufl., Kap. 24, "Biosynthesis of Amino Acids and Heme", S. 575-600 (1988)). Der Ausstoß einer bestimmten Amino-
- 10 säure wird daher durch die Menge dieser Aminosäure in der Zelle eingeschränkt.

II. Vitamine, Cofaktoren und Nutrazeutika-Metabolismus sowie Verwendungen

- Vitamine, Cofaktoren und Nutrazeutika umfassen eine weitere Gruppe von Molekülen. Höhere Tiere haben die Fähigkeit verloren, diese zu synthetisieren und müssen sie somit aufnehmen, obwohl sie leicht durch andere Organismen, wie Bakterien, synthetisiert werden. Diese Moleküle sind entweder biologisch aktive Moleküle an sich oder Vorstufen von biologisch aktiven Substanzen, die als Elektronenträger oder Zwischenprodukte bei einer Reihe von Stoffwechselwegen dienen. Diese Verbindungen haben
- 15 neben ihrem Nährwert auch einen signifikanten industriellen Wert als Farbstoffe, Antioxidantien und Katalysatoren oder andere Verarbeitungs-Hilfsstoffe. (Für einen Überblick über die Struktur, Aktivität und die industriellen Anwendungen dieser Verbindungen siehe bspw. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", Bd. A27, S. 443-613, VCH: Weinheim, 1996). Der Begriff "Vitamin" ist im Fachgebiet bekannt
- 20 und umfaßt Nährstoffe, die von einem Organismus für eine normale Funktion benötigt werden, jedoch nicht von diesem Organismus selbst synthetisiert werden können. Die Gruppe der Vitamine kann Cofaktoren und nutrazeutische Verbindungen umfassen. Der Begriff "Cofaktor" umfaßt nicht-proteinartige Verbindungen, die für das Auftreten einer normalen Enzymaktivität nötig sind. Diese Verbindungen können organisch oder anorganisch sein; die erfindungsgemäßen Cofaktor-Moleküle sind vorzugsweise organisch. Der Begriff "Nutrazeutikum" umfaßt Nahrungsmittelzusätze, die bei Pflanzen und Tieren, insbesondere dem Menschen, gesundheitsfördernd sind. Beispiele solcher Moleküle sind Vitamine, Antioxidantien und ebenfalls bestimmte Lipide (z.B. mehrfach ungesättigte Fettsäuren).
- 25
- 30

35

- Die Biosynthese dieser Moleküle in Organismen, die zu ihrer Produktion befähigt sind, wie Bakterien, ist umfassend charakterisiert worden (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", Bd. A27, S. 443-613, VCH: Weinheim, 1996, Michal, G. (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley & Sons; Ong, A.S., Niki, E. und Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and
- 40

Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for free Radical Research - Asien, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCS Press, Champaign, IL X, 374 S).

- 5 Thiamin (Vitamin B₁) wird durch chemisches Kuppeln von Pyrimidin und Thiazol-Einheiten gebildet. Riboflavin (Vitamin B₂) wird aus Guanosin-5'-triphosphat (GTP) und Ribose-5'-phosphat synthetisiert. Riboflavin wiederum wird zur Synthese von Flavin-mononukleotid (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD) eingesetzt. Die Familie von Verbindungen, die gemeinsam als "Vitamin B₆" bezeichnet werden (bspw. Pyridoxin, 10 Pyridoxamin, Pyridoxal-5'-phosphat und das kommerziell verwendete Pyridoxin-hydrochlorid), sind alle Derivate der gemeinsamen Struktureinheit 5-Hydroxy-6-methylpyridin. Panthothenat (Pantothersäure, R-(+)-N-(2,4-Dihydroxy-3,3-dimethyl-1-oxobutyl)-β-alanin) kann entweder durch chemische Synthese oder durch Fermentation hergestellt werden. Die letzten Schritte bei der Panthothenat-Biosynthese bestehen aus 15 der ATP-getriebenen Kondensation von β-Alanin und Pantothersäure. Die für die Biosyntheseschritte für die Umwandlung in Pantothersäure, in β-Alanin und zur Kondensation in Pantothersäure verantwortlichen Enzyme sind bekannt. Die metabolisch aktive Form von Panthothenat ist Coenzym A, dessen Biosynthese über 5 enzymatische Schritte verläuft. Panthothenat, Pyridoxal-5'-phosphat, Cystein und ATP sind die Vorstufen von 20 Coenzym A. Diese Enzyme katalysieren nicht nur die Bildung von Panthothenat, sondern auch die Produktion von (R)-Pantothersäure, (R)-Pantolacton, (R)-Panthenol (Provitamin B₅), Pantethein (und seinen Derivaten) und Coenzym A.

- 25 Die Biosynthese von Biotin aus dem Vorstufenmolekül Pimeloyl-CoA in Mikroorganismen ist ausführlich untersucht worden, und man hat mehrere der beteiligten Gene identifiziert. Es hat sich herausgestellt, daß viele der entsprechenden Proteine an der Fe-Cluster-Synthese beteiligt sind und zu der Klasse der nifS-Proteine gehören. Die Liponsäure wird von der Octanonsäure abgeleitet und dient als Coenzym beim Energie-Metabolismus, wo sie Bestandteil des Pyruvatdehydrogenasekomplexes und des 30 α-Ketoglutaratdehydrogenasekomplexes wird. Die Folate sind eine Gruppe von Substanzen, die alle von der Folsäure abgeleitet werden, die wiederum von L-Glutaminsäure, p-Aminobenzoessäure und 6-Methylpterin hergeleitet ist. Die Biosynthese der Folsäure und ihrer Derivate, ausgehend von den metabolischen Stoffwechselzwischenprodukten Guanosin-5'-triphosphat (GTP), L-Glutaminsäure und p- 35 Aminobenzoessäure ist in bestimmten Mikroorganismen eingehend untersucht worden.

- 40 Corrinioide (wie die Cobalamine und insbesondere Vitamin B₁₂) und die Porphyrine gehören zu einer Gruppe von Chemikalien, die sich durch ein Tetrapyrrol-Ringsystem auszeichnen. Die Biosynthese von Vitamin B₁₂ ist hinreichend komplex, daß sie noch nicht vollständig charakterisiert worden ist, jedoch ist inzwischen ein Großteil der betei-

ligten Enzyme und Substrate bekannt. Nikotinsäure (Nikotinat) und Nikotinamid sind Pyridin-Derivate, die auch als "Niacin" bezeichnet werden. Niacin ist die Vorstufe der wichtigen Coenzyme NAD (Nikotinamidadenindinukleotid) und NADP (Nikotinamidadenindinukleotidphosphat) und ihrer reduzierten Formen.

5

Die Produktion dieser Verbindungen im Großmaßstab beruht größtenteils auf zellfreien chemischen Synthesen, obwohl einige dieser Chemikalien ebenfalls durch großangelegte Anzucht von Mikroorganismen produziert worden sind, wie Riboflavin, Vitamin B₆, Pantothenat und Biotin. Nur Vitamin B₁₂ wird aufgrund der Komplexität seiner Synthese lediglich durch Fermentation produziert. In-vitro-Verfahren erfordern einen erheblichen Aufwand an Materialien und Zeit und häufig an hohen Kosten.

10

III. Purin-, Pyrimidin-, Nukleosid- und Nukleotid-Metabolismus und Verwendungen

15

Gene für den Purin- und Pyrimidin-Stoffwechsel und ihre entsprechenden Proteine sind wichtige Ziele für die Therapie von Tumorerkrankungen und Virusinfektionen. Der Begriff "Purin" oder "Pyrimidin" umfaßt stickstoffhaltige Basen, die Bestandteil der Nukleinsäuren, Coenzyme und Nukleotide sind. Der Begriff "Nukleotid" beinhaltet die grundlegenden Struktureinheiten der Nukleinsäuremoleküle, die eine stickstoffhaltige Base, einen Pentose-Zucker (bei RNA ist der Zucker Ribose, bei DNA ist der Zucker D-Desoxyribose) und Phosphorsäure umfassen. Der Begriff "Nukleosid" umfaßt Moleküle, die als Vorstufen von Nukleotiden dienen, die aber im Gegensatz zu den Nukleotiden keine Phosphorsäureeinheit aufweisen. Durch Hemmen der Biosynthese dieser Moleküle oder ihrer Mobilisation zur Bildung von Nukleinsäuremolekülen ist es möglich, die RNA- und DNA-Synthese zu hemmen; wird diese Aktivität zielgerichtet bei kanzerogenen Zellen gehemmt, läßt sich die Teilungs- und Replikations-Fähigkeit von Tumorzellen hemmen.

20

25

30

Es gibt zudem Nukleotide, die keine Nukleinsäuremoleküle bilden, jedoch als Energiespeicher (d.h. AMP) oder als Coenzyme (d.h. FAD und NAD) dienen.

35

40

Mehrere Veröffentlichungen haben die Verwendung dieser Chemikalien für diese medizinischen Indikationen beschrieben, wobei der Purin- und/oder Pyrimidin-Metabolismus beeinflußt wird (bspw. Christopherson, R.I. und Lyons, S.D. (1990) "Potent inhibitors of de novo pyrimidine and purine biosynthesis as chemotherapeutic agents", Med. Res. Reviews 10: 505-548). Untersuchungen an Enzymen, die am Purin- und Pyrimidin-Metabolismus beteiligt sind, haben sich auf die Entwicklung neuer Medikamente konzentriert, die bspw. als Immunsuppressionsmittel oder Antiproliferantien verwendet werden können (Smith, J.L. "Enzymes in Nucleotide Synthesis" Curr. Opin. Struct. Biol. 5 (1995) 752-757; Biochem. Soc. Transact. 23 (1995) 877-902). Die Purin-

und Pyrimidinbasen, Nukleoside und Nukleotide haben jedoch auch andere Einsatzmöglichkeiten: als Zwischenprodukte bei der Biosynthese verschiedener Feinchemikalien (z.B. Thiamin, S-Adenosyl-methionin, Folate oder Riboflavin), als Energieträger für die Zelle (bspw. ATP oder GTP) und für Chemikalien selbst, werden
5 gewöhnlich als Geschmacksverstärker verwendet (bspw. IMP oder GMP) oder für viele medizinische Anwendungen (siehe bspw. Kuninaka, A., (1996) "Nucleotides and Related Compounds in Biotechnology Bd. 6, Rehm et al., Hrsg. VCH: Weinheim, S. 561-612). Enzyme, die am Purin-, Pyrimidin-, Nukleosid- oder Nukleotid-Metabolismus beteiligt sind, dienen auch immer stärker als Ziele, gegen die Chemikalien für den
10 Pflanzenschutz, einschließlich Fungiziden, Herbiziden und Insektiziden entwickelt werden.

Der Metabolismus dieser Verbindungen in Bakterien ist charakterisiert worden (für Übersichten siehe bspw. Zalkin, H. und Dixon, J.E. (1992) "De novo purin nucleotide biosynthesis" in Progress in Nucleic Acids Research and Molecular biology, Bd. 42, Academic Press, S. 259-287; und Michal, G. (1999) "Nucleotides and Nucleosides";
15 Kap. 8 in : Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, Wiley, New York). Der Purin-Metabolismus, das Objekt intensiver Forschung, ist für das normale Funktionieren der Zelle essentiell. Ein gestörter Purin-Metabolismus in höheren Tieren kann schwere Erkrankungen verursachen, bspw. Gicht. Die Purinnukleotide werden über eine Reihe von Schritten über die Zwischenverbindung Inosin-5'-phosphat (IMP) aus Ribose-5-phosphat synthetisiert, was zur Produktion von Guanosin-5'-
20 monophosphat (GMP) oder Adenosin-5'-monophosphat (AMP) führt, aus denen sich die als Nukleotide verwendeten Triphosphatformen leicht herstellen lassen. Diese Verbindungen werden auch als Energiespeicher verwendet, so daß ihr Abbau Energie für
25 viele verschiedene biochemische Prozesse in der Zelle liefert. Die Pyrimidinbiosynthese erfolgt über die Bildung von Uridin-5'-monophosphat (UMP) aus Ribose-5-phosphat. UMP wiederum wird in Cytidin-5'-triphosphat (CTP) umgewandelt. Die Desoxyformen sämtlicher Nukleotide werden in einer Einschnitt-Reduktionsreaktion aus der
Diphosphat-Riboseform des Nukleotides zur Diphosphat-Desoxyriboseform des Nukle-
30 otides hergestellt. Nach der Phosphorylierung können diese Moleküle an der DNA-Synthese teilnehmen.

IV. Trehalose-Metabolismus und Verwendungen

35 Trehalose besteht aus zwei Glucosemolekülen, die über α,α -1,1-Bindung miteinander verknüpft sind. Sie wird gewöhnlich in der Nahrungsmittelindustrie als Süßstoff, als Additiv für getrocknete oder gefrorene Nahrungsmittel sowie in Getränken verwendet. Sie wird jedoch auch in der pharmazeutischen Industrie, der Kosmetik- und Biotechnologie-Industrie angewendet (s. bspw. Nishimoto et al., (1998) US-Patent Nr. 5 759 610;
40 Singer, M.A. und Lindquist, S. Trends Biotech. 16 (1998) 460-467; Paiva, C.L.A. und

Panek, A.D. Biotech Ann. Rev. 2 (1996) 293-314; und Shiosaka, M. J. Japan 172 (1997) 97-102). Trehalose wird durch Enzyme von vielen Mikroorganismen produziert und auf natürliche Weise in das umgebende Medium abgegeben, aus dem sie durch im Fachgebiet bekannte Verfahren gewonnen werden kann.

5

Besonders bevorzugte biosynthetische Produkte sind ausgewählt aus der Gruppe organische Säuren, Proteine, Nukleotide und Nukleoside, sowohl proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, Lipide und Fettsäuren, Diöle, Kohlehydrate, aromatische Verbindungen, Vitamine und Cofaktoren, Enzyme und Proteine.

10

Bevorzugte organische Säuren sind Weinsäure, Itaconsäure und Diaminopimelinsäure

Bevorzugte Nukleoside und Nukleotide sind beispielsweise beschrieben in Kuninaka, A. (1996) Nucleotides and related compounds, S. 561-612, in Biotechnology Bd. 6, Rehm et al., Hrsg. VCH: Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten.

15

Bevorzugte biosynthetische Produkte sind weiterhin Lipide, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren, wie beispielsweise Arachidonsäure, Diöle wie beispielsweise Propandiol und Butandiol, Kohlenhydrate, wie beispielsweise Hyaluronsäure und Trehalose, aromatische Verbindungen, wie beispielsweise aromatische Amine, Vanillin und Indigo, Vitamine und Cofaktoren, wie beispielsweise beschrieben in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A27, "Vitamins", S. 443-613 (1996) VCH: Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten; und Ong, A.S., Niki, E. und Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research - Asien, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCS Press (1995)), Enzyme Polyketide (Cane et al. (1998) *Science* 282: 63-68), und sämtliche anderen von Gutcho (1983) in Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086 und den darin angegebenen Literaturstellen, beschriebenen Chemikalien.

20

25

Besonders bevorzugte biosynthetische Produkte sind Aminosäuren, besonders bevorzugt essentielle Aminosäuren, insbesondere L-Glycin, L-Alanin, L-leucin, L-Methionin, L-Phenylalanin, L-Tryptophan, L-Lysin, L-Glutamin, L-Glutaminsäure, L-Serin, L-Prolin, L-Valin, L-Isoleucin, L-Cystein, L-Tyrosin, L-Histidin, L-Arginin, L-Asparagin, L-Asparaginsäure und L-Threonin, L-Homoserin, insbesondere L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin. Im folgenden wird unter einer Aminosäure, wie beispielsweise Lysin, Methionin und Threonin, sowohl jeweils die L- und die D-Form der Aminosäure, vorzugsweise die L-Form, also beispielsweise L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin verstanden.

30

35

40

Die Erfindung betrifft insbesondere ein Verfahren zur Herstellung von Lysin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen mit erhöhter oder verursachter Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp, wobei man

- 5 ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheit, die die Expression der endogenen Gene reguliert, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

- 10 dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind,

- 15 und wobei die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Diaminopimelat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Diaminopimelat-Decarboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Dihydrodipicolinate-Synthetase, Nukleinsäuren kodierend eine Dihydrodipicolinate-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-Phosphoglycerat-Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat-Isomerase, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LuxR, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LysR1, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LysR2, Nukleinsäuren kodierend eine Malat-Quinon-Oxoreduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Transketolase, Nukleinsäuren kodierend eine Transaldolase, Nukleinsäuren kodierend einen Lysin Exporter, Nukleinsäuren kodierend eine Biotin-Ligase, Nukleinsäuren kodierend eine Arginyl-t-RNA-Synthetase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Fruktose-1,6-bisphosphatase, Nukleinsäuren kodierend ein Protein OPCA, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Phosphofructokinase und Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphofructokinase.

- 35 Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Expression dieser Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) dadurch erreicht, dass man

- 40 dh1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus ein-

bringt, so dass die Expression eines oder mehrerer dieser endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

- 5 dh2) ein oder mehrere dieser Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder
- 10 dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

- 15 Eine weiter bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Lysin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe
- 20 Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Diaminopimelat-Dehydrogenase-Aktivität, Diaminopimelat-Decarboxylase-Aktivität, Dihydrodipicolinate-Synthetase-Aktivität, Dihydrodipicolinate-Reduktase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat-Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat-Isomerase-Aktivität, Aktivität des Transkriptionellen Regulators LuxR, Aktivität des Transkriptionellen Regulators LysR1, Aktivität
- 25 des Transkriptionellen Regulators LysR2, Malat-Quinon-Oxodoreduktase-Aktivität, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase-Aktivität, Transketolase-Aktivität, Transaldolase-Aktivität, Lysin-Exporter-Aktivität, Arginyl-t-RNA-Synthetase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität, Fruktose-1,6-bisphosphatase-Aktivität, Protein OpcA-Aktivität, 1-Phosphofructokinase-Aktivität, 6-Phosphofructokinase-Aktivität und Biotin-Ligase-Aktivität aufweisen.
- 30

- Eine weiter besonders bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Lysin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Threonin Dehydratase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Homoserine-Kinase-Aktivität, Homoserin-Dehydrogenase-Aktivität, Threonin-Exporter-Aktivität, Threonin-Efflux-Protein-Aktivität, Asparaginase-Aktivität, Aspartat-
- 35

Decarboxylase-Aktivität und Threonin-Synthase-Aktivität aufweisen.

5 Diese zusätzlichen, erhöhten oder reduzierten Aktivitäten mindestens einer der vorstehend beschriebenen Aktivitäten können, müssen aber nicht durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität und/oder eine erfindungsgemäße Expressionseinheit verursacht sein.

10 Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von Methionin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen mit erhöhter oder verursachter Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp, wobei man

15 ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheit, die die Expression der endogenen Gene reguliert, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

20 dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind,

25 und wobei die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-
30 Phosphoglycerat Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat Isomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin O-Acetyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystathionin-gamma-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystathionin-beta-Lyase, Nukleinsäuren kodierend eine Serin-Hydroxymethyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase, Nukleinsäuren kodierend eine Methylene-
35 Tetrahydrofolat-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoserin-Aminotransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoserin-Phosphatase, Nukleinsäuren kodierend eine Serine Acetyl-Transferase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystein-Synthase Aktivität I, Nukleinsäuren kodierend eine Cystein-Synthase Aktivität
40 II, Nukleinsäuren kodierend eine Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine Sulfat-Adenylyltransferase-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoadenosin-Phosphosulfat-Reductase-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine Ferredoxin-Sulfit-Reduktase-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine Ferredoxin NADPH-Reduktase Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine

Ferredoxin-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA247, Nukleinsäuren kodierend eine, RXA0655 Regulator und Nukleinsäuren kodierend einen RXN2910 Regulator.

5

Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Expression dieser Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) dadurch erreicht, dass man

10

dh1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer dieser endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

15

dh2) ein oder mehrere dieser Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

20

dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

25

Eine weiter bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Methionin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Homoserin Dehydrogenase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat Isomerase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, Cystathionin-gamma-Synthase-Aktivität, Cystathionin-beta-Lyase-Aktivität Serin-Hydroxymethyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase-Aktivität, Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase-Aktivität, Phosphoserin-Aminotransferase-Aktivität, Phosphoserin-Phosphatase-Aktivität, Serine Acetyl-Transferase-Aktivität, Cystein-Synthase-Aktivität, Cystein-Synthase II -Aktivität, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfat-Adenylyltransferase-Aktivität, Phosphoadenosin-

30

35

40

Phosphosulfat-Reductase-Aktivität, Ferredoxin-Sulfit-Reduktase-Aktivität, Ferredoxin NADPH-Reduktase Aktivität, Ferredoxin-Aktivität Aktivität Proteins der Sulfat-Reduktion RXA077, Aktivität eines Proteins der Sulfat-Reduktion RXA248, Aktivität eines Proteins der Sulfat-Reduktion RXA247, Aktivität eines RXA655-Regulators und
5 Aktivität eines RXN2910-Regulators aufweisen

Eine weiter besonders bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Methionin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzier-
10 te Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Homoserine-Kinase-Aktivität, Threonin-Dehydratase-Aktivität, Threonin Synthase-Aktivität, Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Synthase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Reduktase-Aktivität, und Diaminopicolinat Decarboxylase-Aktivität aufweisen.

15 Diese zusätzlichen, erhöhten oder reduzierten Aktivitäten mindestens einer der vorstehend beschriebenen Aktivitäten können, müssen aber nicht durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität und/oder eine erfindungsgemäße Expressionseinheit verursacht sein.

20 Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von Threonin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen mit erhöhter oder verursachter Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp, wobei man

25 ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheit, die die Expression der endogenen Gene reguliert, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

30 dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind,

und wobei die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine
35 Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-Phosphoglycerat Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat Isomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin-Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Threonin
40 Synthase, Nukleinsäuren kodierend einen Threonin Exporter Carrier, Nukleinsäuren

10 kodierend eine Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine
Transaldolase, Nukleinsäuren kodierend eine Transketolase, Nukleinsäuren kodierend
einer Malat-Quinon-Oxidoreductase, Nukleinsäuren kodierend eine 6-
Phosphogluconat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend einen Lysin-Exporter,
5 Nukleinsäuren kodierend eine Biotin-Ligase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoe-
nolpyruvat-Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend ein Threonin Efflux-Protein, Nuklein-
säuren kodierend eine Fruktose-1,6-bisphosphatase, Nukleinsäuren kodierend ein Op-
cA Protein, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Phosphofructokinase, Nukleinsäuren ko-
dierend eine 6-Phosphofructokinase, und Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin-
10 Dehydrogenase

15 Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Expression
dieser Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten o-
der durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressi-
onsaktivität gemäß Ausführungsform ch) dadurch erreicht, dass man

dh1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit
erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus ein-
bringt, so dass die Expression eines oder mehrerer dieser endogenen Gene unter der
20 Kontrolle der eingebrachten, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenen-
falls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

dh2) ein oder mehrere dieser Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so
dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle
25 der endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöh-
ter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße
Expressionseinheit, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und
funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mik-
roorganismus einbringt.
30

Eine weiter bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens
zur Herstellung von Threonin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch
35 veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte
Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe
Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Glycerinal-
dehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat Kinase-Aktivität, Pyru-
vat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat Isomerase-Aktivität, Threonin Synthase-
40 Aktivität, Aktivität eines Threonin Export-Carriers, Transaldolase-Aktivität, Transketola-

se-Aktivität, Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase-Aktivität, Malat-Qinon-Oxidoreductase-Aktivität, Homoserin-Kinase-Aktivität, Biotin-Ligase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität, Threonin-Efflux-Protein-Aktivität, Protein OpcA-Aktivität, 1-Phosphofructokinase-Aktivität, 6-Phosphofructokinase-Aktivität, Fruktose 1,6 bisphosphatase-Aktivität, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase und Homoserin-Dehydrogenase-Aktivität aufweisen.

Eine weiter besonders bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Threonin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Threonin Dehydratase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, Serin-Hydroxymethyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase-Aktivität, Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Synthetase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Reduktase-Aktivität, Asparaginase-Aktivität, Aspartat-Decarboxylase-Aktivität, Lysin-Exporter-Aktivität, Acetolactat-Synthase-Aktivität, Ketol-Aid-Reductoisomerase-Aktivität, Branched chain aminotransferase-Aktivität, Coenzym B12-abhängige Methionin Synthase-Aktivität, Coenzym B12-unabhängige Methion Synthase-Aktivität, Dihydroxy-acid Dehydratase-Aktivität und Diaminopicolinat Decarboxylase-Aktivität aufweisen.

Diese zusätzlichen, erhöhten oder reduzierten Aktivitäten mindestens einer der vorstehend beschriebenen Aktivitäten können, müssen aber nicht durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität und/oder eine erfindungsgemäße Expressionseinheit verursacht sein.

Unter dem Begriff der „Aktivität“ eines Proteins wird bei Enzymen die Enzymaktivität des entsprechenden Proteins, bei anderen Proteinen, beispielsweise Struktur oder Transport-Proteinen die physiologische Aktivität der Proteine verstanden.

Die Enzyme sind in der Regel in der Lage ein Substrat in ein Produkt umzuwandeln bzw. diesen Umwandlungsschritt zu katalysieren.

Dementsprechend wird unter der „Aktivität“ eines Enzyms die in einer bestimmten Zeit durch das Enzym umgesetzte Menge Substrat bzw. gebildete Menge Produkt verstanden.

Bei einer erhöhten Aktivität im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Enzym die umgesetzte Menge Substrat

bzw. die gebildete Menge Produkt erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der „Aktivität“ bei allen vorstehend und nachstehend beschriebenen Aktivitäten mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der „Aktivität des Wildtyps“.

Bei einer reduzierten Aktivität im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Enzym die umgesetzte Menge Substrat bzw. die gebildete Menge Produkt reduziert.

Unter einer reduzierten Aktivität wird vorzugsweise die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität diese Enzyms in einem Mikroorganismus verstanden.

Eine Reduzierung der Aktivität umfasst eine mengenmäßige Verringerung eines Enzyms bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen des Enzyms (d.h. fehlende Nachweisbarkeit der entsprechenden Aktivität oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit des Enzyms). Vorzugsweise wird die Aktivität im Mikroorganismus im Vergleich zum Wildtyp um mindestens 5 %, weiter bevorzugt um mindestens 20 %, weiter bevorzugt um mindestens 50 %, weiter bevorzugt um 100 % reduziert. Insbesondere meint „Reduzierung“ auch das vollständigen Fehlen der entsprechenden Aktivität.

Die Aktivität bestimmter Enzyme in genetisch veränderten Mikroorganismen sowie im Wildtyp und damit die Erhöhung oder Reduzierung der Enzymaktivität lassen sich nach bekannten Verfahren, wie beispielsweise Enzymassays ermitteln.

Beispielsweise wird unter eine Pyruvatcarboxylase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Pyruvat in Oxaloacetat umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter einer Pyruvatcarboxylase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Pyruvatcarboxylase umgesetzte Menge Pyruvat bzw. gebildete Menge Oxaloacetat verstanden.

Bei einer erhöhten Pyruvatcarboxylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Pyruvatcarboxylase die umgesetzte Menge Pyruvat bzw. die gebildete Menge Oxaloacetat erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Pyruvatcarboxylase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Pyruvatcarboxylase -Aktivität des Wildtyps.

Weiterhin wird beispielsweise unter eine Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität die Enzymaktivität einer Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase verstanden.

10 Unter einer Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Oxaloacetat in Phosphoenolpyruvat umzuwandeln.

15 Dementsprechend wird unter Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Phosphoenolpyruvat umgesetzte Menge Oxaloacetat bzw. gebildete Menge Phosphoenolpyruvat verstanden.

Bei einer reduzierten Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase die umgesetzte Menge Oxaloacetat bzw. 20 die gebildete Menge Phosphoenolpyruvat reduziert.

Eine Reduzierung der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität umfasst eine mengenmäßige Verringerung einer Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (d.h. 25 fehlende Nachweisbarkeit von Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase). Vorzugsweise wird die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp um mindestens 5 %, weiter bevorzugt um mindestens 20 %, weiter bevorzugt um mindestens 50 %, weiter bevorzugt um 100 % reduziert. Insbesondere meint "Reduzierung" auch das vollständigen Fehlen der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase - 30 Aktivität.

Die zusätzliche Erhöhung von Aktivitäten kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen 35 auf Expressions- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression von Nukleinsäuren kodierend die vorstehend beschriebenen Proteine gegenüber dem Wildtyp.

Die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäuren kodierend die vorstehend beschriebenen Proteine gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege 40 erfolgen, beispielsweise durch Induzierung des Gens durch Aktivatoren oder wie

vorstehend beschrieben durch Erhöhung der Promotoraktivität oder Erhöhung der Expressionsaktivität oder durch Einbringen von einer oder mehrerer Genkopien in den Mikroorganismus.

- 5 Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend ein Protein wird erfindungsgemäß auch die Manipulation der Expression der Mikroorganismus eigenen, endogenen Proteine verstanden.

- 10 Dies kann beispielsweise, wie vorstehend beschrieben durch Veränderung der Promotor- und/oder Expressionseinheits-Sequenzen der Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine erhöhte Expressionsrate des Gens zur Folge hat, kann beispielsweise durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

- 15 Es ist, wie vorstehend beschrieben, möglich, die Expression der endogenen Proteine durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdstoffen erfolgen.

- 20 Zur Erzielung einer Erhöhung der Genexpression kann der Fachmann weitere unterschiedliche Maßnahmen einzeln oder in Kombination ergreifen. So kann beispielsweise die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der mRNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

- 35 Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Biotechnology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift 0472869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Biotechnology 9, 84-87 (1991)), bei Remscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15-24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-40 10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195

(1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60 : 512-538 (1996) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

5 Weiterhin kann es für die Produktion von biosynthetischen Produkten, insbesondere L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin, vorteilhaft sein, neben der Expression bzw. Verstärkung eines Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanz, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

10 In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eines der vorstehend beschriebenen Proteine durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend ein entsprechendes Protein in den Mikroorganismus. Das Einbringen der Nukleinsäure kann chromosomal oder extrachromosomal erfolgen, also durch Erhöhung der Kopienzahl auf dem Chromosom und oder
15 eine Kopie des Gens auf einem sich replizierenden Plasmid in dem Wirtsmikroorganismus.

Vorzugsweise erfolgt das Einbringen der Nukleinsäure, beispielsweise in Form einer Expressionskassette, enthaltend die Nukleinsäure, chromosomal, insbesondere durch
20 die vorstehend beschriebene SacB-Methode.

Dazu kann prinzipiell jedes Gen, das eines der vorstehend beschriebenen Proteine kodiert verwendet werden.

25 Bei genomischen Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall das der Wirtsmikroorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Proteine zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

30 Beispiele für die entsprechenden Gene sind in Tabelle 1 und 2 aufgelistet.

Vorzugsweise erfolgt die Reduzierung der vorstehend beschriebenen Aktivitäten in Mikroorganismen durch mindestens eines der nachfolgenden Verfahren:

- 35
- Einbringen mindestens einer sense-Ribonukleinsäuresequenz zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette

70

- Einbringen mindestens eines DNA- oder Protein-bindenden Faktors gegen das entsprechende -Gen, -RNA oder -Protein oder einer dessen Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 5
- Einbringen mindestens einer den RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 10
- Einbringen mindestens eines Konstruktes zur Erzeugung eines Funktionsverlustes, wie beispielsweise die Generierung von Stopp-Kodons oder eine Verschiebungen im Leseraster, an einem Gen beispielsweise durch Erzeugung einer Insertion, Deletion, Inversion oder Mutation in einem Gen. Bevorzugt können Knockout-Mutanten mittels gezielter Insertion in das gewünschte Zielgen durch homologe Rekombination oder Einbringen von sequenzspezifischen Nukleasen gegen das Zielgen generiert werden.
- 15
- Einbringen eines Promotors mit reduzierter Promotoraktivität oder einer Expressionseinheit mit reduzierter Expressionsaktivität.

20 Dem Fachmann ist bekannt, dass auch weitere Verfahren im Rahmen der vorliegenden Erfindung zur Reduzierung seiner Aktivität oder Funktion eingesetzt werden können. Beispielsweise kann auch das Einbringen einer dominant-negativen Variante eines Proteins oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette vorteilhaft sein.

25 Dabei kann jedes einzelne dieser Verfahren eine Verminderung der Proteinmenge, mRNA-Menge und/oder Aktivität eines Proteins bewirken. Auch eine kombinierte Anwendung ist denkbar. Weitere Methoden sind dem Fachmann bekannt und können die Behinderung oder Unterbindung der Prozessierung des Proteins, des Transports des Proteins oder dessen mRNA, Hemmung der Ribosomenanlagerung, Hemmung des

30 RNA-Spleißens, Induktion eines RNA abbauenden Enzyms und/oder Hemmung der Translationselongation oder -termination umfassen.

Im erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten wird vorzugsweise dem Kultivierungsschritt der genetisch veränderten Mikroorganismen ein

35 Isolieren von biosynthetischen Produkten aus den Mikroorganismen oder/oder aus der Fermentationsbrühe angeschlossen. Diese Schritte können gleichzeitig und/oder vorzugsweise nach dem Kultivierungsschritt stattfinden.

40 Die erfindungsgemäßen genetisch veränderten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch- Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulauf-

verfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zur Produktion von biosynthetischen Produkten, insbesondere L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin, kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) zu finden.

Das zu verwendende Kulturmedium hat in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme zu genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods für General Bacteriology" der American Society für Bacteriology (Washington D. C., USA, 1981) enthalten.

Diese erfindungsgemäß einsetzbaren Medien umfassen gewöhnlich eine oder mehrere Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen, anorganische Salze, Vitamine und/oder Spurenelemente.

Bevorzugte Kohlenstoffquellen sind Zucker, wie Mono-, Di- oder Polysaccharide. Sehr gute Kohlenstoffquellen sind beispielsweise Glucose, Fructose, Mannose, Galactose, Ribose, Sorbose, Ribulose, Lactose, Maltose, Saccharose, Raffinose, Stärke oder Cellulose. Man kann Zucker auch über komplexe Verbindungen, wie Melassen, oder andere Nebenprodukte der Zucker-Raffinierung zu den Medien geben. Es kann auch vorteilhaft sein, Gemische verschiedener Kohlenstoffquellen zuzugeben. Andere mögliche Kohlenstoffquellen sind Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure oder Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin, Methanol oder Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure oder Milchsäure.

Stickstoffquellen sind gewöhnlich organische oder anorganische Stickstoffverbindungen oder Materialien, die diese Verbindungen enthalten. Beispielhafte Stickstoffquellen umfassen Ammoniak-Gas oder Ammoniumsalze, wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat oder Ammoniumnitrat, Nitrate, Harnstoff, Aminosäuren oder komplexe Stickstoffquellen, wie Maisquellwasser, Sojamehl, Sojaprotein, Hefeextrakt, Fleischextrakt und andere. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Anorganische Salzverbindungen, die in den Medien enthalten sein können, umfassen die Chlorid-, Phosphor- oder Sulfatsalze von Calcium, Magnesium, Natrium, Kobalt, Molybdän, Kalium, Mangan, Zink, Kupfer und Eisen

Als Schwefelquelle für die Herstellung von Feinchemikalien, insbesondere von Methionin, können anorganische Verbindungen wie beispielsweise Sulfate, Sulfite, Dithionite, Tetrathionate, Thiosulfate, Sulfide aber auch organische Schwefelverbindungen, wie Mercaptane und Thiole, verwendet werden.

5

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden.

10

Chelatbildner können zum Medium gegeben werden, um die Metallionen in Lösung zu halten. Besonders geeignete Chelatbildner umfassen Dihydroxyphenole, wie Catechol oder Protocatechuat, oder organische Säuren, wie Citronensäure.

15

Die erfindungsgemäß eingesetzten Fermentationsmedien enthalten üblicherweise auch andere Wachstumsfaktoren, wie Vitamine oder Wachstumsförderer, zu denen beispielsweise Biotin, Riboflavin, Thiamin, Folsäure, Nikotinsäure, Panthothenat und Pyridoxin gehören. Wachstumsfaktoren und Salze stammen häufig von komplexen Medienkomponenten, wie Hefeextrakt, Melassen, Maisquellwasser und dergleichen. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genaue

20

Zusammensetzung der Medienverbindungen hängt stark vom jeweiligen Experiment ab und wird für jeden spezifischen Fall individuell entschieden. Information über die Medienoptimierung ist erhältlich aus dem Lehrbuch "Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach" (Hrsg. P.M. Rhodes, P.F. Stanbury, IRL Press (1997) S. 53-73, ISBN 0 19 963577 3). Wachstumsmedien lassen sich auch von kommerziellen Anbietern beziehen, wie Standard 1 (Merck) oder BHI (Brain heart infusion, DIFCO) und dergleichen.

25

30

Sämtliche Medienkomponenten werden, entweder durch Hitze (20 min bei 1,5 bar und 121°C) oder durch Sterilfiltration, sterilisiert. Die Komponenten können entweder zusammen oder nötigenfalls getrennt sterilisiert werden. Sämtliche Medienkomponenten können zu Beginn der Anzucht zugegen sein oder wahlfrei kontinuierlich oder chargenweise hinzugegeben werden.

35

Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise zwischen 15°C und 45°C, vorzugsweise bei 25°C bis 40°C und kann während des Experimentes konstant gehalten oder verändert werden. Der pH-Wert des Mediums sollte im Bereich von 5 bis 8,5, vorzugsweise um 7,0 liegen. Der pH-Wert für die Anzucht läßt sich während der Anzucht durch Zugabe von basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure kontrollieren. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel,

40

73

wie z. B. Fettsäurepolyglykolester, eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe, wie z. B. Antibiotika, hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen, wie z. B. Umgebungsluft, in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die so erhaltenen Fermentationsbrühen haben üblicherweise eine Trockenmasse von 7,5 bis 25 Gew.-%.

Vorteilhaft ist außerdem auch, wenn die Fermentation zumindest am Ende, insbesondere jedoch über mindestens 30% der Fermentationsdauer zuckerlimitiert gefahren wird. Das heißt, dass während dieser Zeit die Konzentration an verwertbarem Zucker im Fermentationsmedium auf 0 bis 3 g/l gehalten, beziehungsweise abgesenkt wird.

Die Isolierung von biosynthetischen Produkten aus der Fermentationsbrühe und/oder den Mikroorganismen erfolgt in an sich bekannter Weise entsprechend den physikalisch-chemischen Eigenschaften des biosynthetischen Wertprodukts und den biosynthetischen Nebenprodukten.

Die Fermentationsbrühe kann anschließend beispielsweise weiterverarbeitet werden. Je nach Anforderung kann die Biomasse ganz oder teilweise durch Separationsmethoden, wie z. B. Zentrifugation, Filtration, Dekantieren oder einer Kombination dieser Methoden aus der Fermentationsbrühe entfernt oder vollständig in ihr belassen werden.

Anschließend kann die Fermentationsbrühe mit bekannten Methoden, wie z. B. mit Hilfe eines Rotationsverdampfers, Dünnschichtverdampfers, Fallfilmverdampfers, durch Umkehrosmose, oder durch Nanofiltration, eingedickt beziehungsweise aufkonzentriert werden. Diese aufkonzentrierte Fermentationsbrühe kann anschließend durch Gefriertrocknung, Sprühtrocknung, Sprühgranulation oder durch anderweitige Verfahren aufgearbeitet werden.

Es ist aber auch möglich die biosynthetischen Produkte, insbesondere L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin, weiter aufzureinigen. Hierzu wird die produkthaltige Brühe nach dem Abtrennen der Biomasse einer Chromatographie mit einem geeigneten Harz unterworfen, wobei das gewünschte Produkt oder die Verunreinigungen ganz oder teilweise auf dem Chromatographieharz zurückgehalten werden. Diese Chromatographieschritte können nötigenfalls wiederholt werden, wobei die gleichen oder ande-

re Chromatographieharze verwendet werden. Der Fachmann ist in der Auswahl der geeigneten Chromatographieharze und ihrer wirksamsten Anwendung bewandert. Das gereinigte Produkt kann durch Filtration oder Ultrafiltration konzentriert und bei einer Temperatur aufbewahrt werden, bei der die Stabilität des Produktes maximal ist.

5

Die biosynthetischen Produkte können in unterschiedlichen Formen anfallen, beispielsweise in Form ihrer Salze oder Ester.

10

Die Identität und Reinheit der isolierten Verbindung(en) kann durch Techniken des Standes der Technik bestimmt werden. Diese umfassen Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC), spektroskopische Verfahren, Färbeverfahren, Dünnschichtchromatographie, NIRS, Enzymtest oder mikrobiologische Tests. Diese Analyseverfahren sind zusammengefaßt in: Patek et al. (1994) Appl. Environ. Microbiol. 60:133-140; Malakhova et al. (1996) Biotekhnologiya 11 27-32; und Schmidt et al. (1998) Bioprocess Engineer. 19:67-70. Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1996) Bd. A27, VCH: Weinheim, S. 89-90, S. 521-540, S. 540-547, S. 559-566, 575-581 und S. 581-587; Michal, G (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley and Sons; Fallon, A. et al. (1987) Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17.

15

20

Die Erfindung wird nun anhand der folgenden nicht-limitierenden Beispiele näher beschrieben:

25

Beispiel 1

Konstruktion von Plasmid pCIS lysC

30

Im ersten Schritt der Stammkonstruktion wurde ein allelischer Austausch des lysC Wildtypgens in Corynebakterium glutamicum ATCC13032 durchgeführt. Dabei wurde im lysC Gen ein Nukleotidaustausch durchgeführt, so daß im resultierenden Protein die Aminosäure Thr an der Position 311 durch ein Ile ausgetauscht wurde. Ausgehend von der chromosomalen DNA aus ATCC13032 als Template für eine PCR Reaktion wurde mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO:5 und SEQ ID NO:6 lysC mit Hilfe des Pfu-Turbo PCR Systems (Stratagene USA) nach Angaben des Herstellers amplifiziert.

35

SEQ ID NO:5

5'-GAGAGAGAGACGCGTCCCAGTGGCTGAGACGCATC -3'

40

SEQ ID NO:6

5'-CTCTCTCTGTCGACGAATTCAATCTTACGGCCTG-3'

- Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde nach Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 oder Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828 präpariert. Das amplifizierte Fragment wird an seinem 5'-Ende von einem Sall Restriktionsschnitt und an seinem 3'-Ende von einem MluI Restriktionsschnitt flankiert. Vor der Klonierung wurde das amplifizierte Fragment durch diese beiden Restriktionsenzyme verdaut und mit GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) aufgereinigt.
- Das erhaltenen Polynukleotid wurde über die Sall und MluI Restriktionsschnitte in pCLIK5 MCS integrativ SacB im folgenden pCIS genannt (SEQ ID NO: 7) kloniert und in *E.coli* XL-1 blue transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht. Das Plasmid wurden isoliert und durch Sequenzierung die erwartete Nukleotidsequenz bestätigt. Die Präparation der Plasmid DNA wurde nach Methoden und mit Materialien der Fa. Quiagen durchgeführt. Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzierreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet. Das erhaltene Plasmid pCIS lysC ist als SEQ ID NO:8 aufgeführt.

Beispiel 2

Mutagenese des lysC Gens aus *C. glutamicum*

- Die gerichtete Mutagenese des lysC Gens aus *C. glutamicum* wurde mit dem Quick-Change Kit (Fa. Stratagene/USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Mutagenese wurde im Plasmid pCIS lysC, SEQ ID NO:8 durchgeführt. Für den Austausch von thr 311 nach 311ile mit Hilfe der Quickchange Methode (Stratagene) wurden folgende Oligonukleotidprimer synthetisiert:

SEQ ID NO:9

5'-CGGCACCACCGACATCATCTTCACCTGCCCTCGTTCCG -3'

SEQ ID NO:10

- 5'-CGGAACGAGGGCAGGTGAAGATGATGTCGGTGGTGCCG -3'

- Der Einsatz dieser Oligonukleotidprimer in der Quickchange Reaktion führt in dem lysC Gen SEQ ID NO:11 zu einem Austausch des Nukleotids in Position 932 (von C nach T). Der resultierende Aminosäureaustausch Thr311Ile im lysC Gen wurde nach Transformation in *E.coli* XL1-blue und Plasmidpräparation durch ein Sequenzierungsreaktio-

nen bestätigt. Das Plasmid erhielt die Bezeichnung pCIS lysC thr311ile und ist als SEQ ID NO:12 aufgeführt.

Das Plasmid pCIS lysC thr311ile wurde in *C. glutamicum* ATCC13032 mittels Elektroporation wie bei Liebl, et al. (1989) FEMS Microbiology Letters 53:299-303 beschrieben, transformiert. Modifikationen des Protokolls sind in DE 10046870 beschrieben. Die chromosomale Anordnung des lysC-Lokus einzelner Transformanten wurde mit Standardmethoden durch Southernblot und Hybridisierung wie in Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben, überprüft. Dadurch wurde sichergestellt, daß es sich bei den Transformanten um solche handelt, die das transformierte Plasmid durch homologe Rekombination am lysC-Lokus integriert haben. Nach Wachstum solcher Kolonien über Nacht in Medien, die kein Antibiotikum enthalten, werden die Zellen auf ein Saccharose-CM-Agarmedium (10% Saccharose, 10 g/l Glucose; 2,5 g/l NaCl; 2 g/l Harnstoff, 10 g/l Bacto Peptone (Fa. Difco); 10 g/l Hefeextrakt, 22,0 g/L Agar (Difco)) ausplattiert und bei 30°C für 24 Stunden inkubiert.

Da das im Vektor pCIS lysC thr311ile enthaltende sacB Gen Saccharose in ein toxisches Produkt umwandelt, können nur solche Kolonien anwachsen, die das sacB Gen durch einen zweiten homologen Rekombinationsschritt zwischen dem Wildtyp lysC Gen und dem mutierten Gen lysC thr311ile deletiert haben. Während der homologen Rekombination kann entweder das Wildtyp Gen, oder das mutierte Gen zusammen mit dem sacB Gen deletiert werden. Wenn das sacB Gen zusammen mit dem Wildtyp Gen entfernt wird, resultiert eine mutierte Transformante.

Anwachsende Kolonien wurden gepickt, und auf eine Kanamycin-sensitiven Phänotyp hin untersucht. Klone mit deletiertem SacB Gen müssen gleichzeitig Kanamycin sensitives Wachstumsverhalten zeigen. Solche Kan-sensitiven Klone wurde im einem Schüttelkolben auf ihre Lysin-Produktivität hin untersucht (siehe Beispiel 6). Zum Vergleich wurde der nicht behandelte *C. glutamicum* ATCC13032 angezogen. Klone mit einer gegenüber der Kontrolle erhöhten Lysin-Produktion wurden selektiert, chromosomale DNA gewonnen und der entsprechende Bereich des lysC Gens durch eine PCR-Reaktion amplifiziert und sequenziert. Ein solcher Klon mit der Eigenschaft erhöhter Lysin-Synthese und nachgewiesener Mutation in lysC an der Stelle 932 wurde mit ATCC13032 lysC^{fbr} bezeichnet.

Beispiel 3

Herstellung eines Integrationsplasmids zur Überexpression des lysC-Gens mit Hilfe der heterologen Expressionseinheit Psod (SEQ. ID. NO. 2)

Zur Amplifizierung der Expressionseinheit des Gens, das für die Superoxiddismutase kodiert, wurden die folgenden Oligonukleotide definiert.

SEQ ID 13:

5 sod8: 5'- accctggcggaaaccctgagtcg -3'

SEQ ID 14:

sod1: 5'- tacgaccagggccacgggtaaaaaatccttcgtaggtttccgcaccgagcatatacatcttttg-3'

10 Die Primer wurden in eine PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA von *C. glutamicum* ATCC 13032 eingesetzt. Mit diesem Ansatz konnte ein DNA-Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von 657 bp entsprach.

15 Zur Amplifizierung des Gens, das für die Aspartokinase kodiert, wurden die folgenden Oligonukleotide definiert.

SEQ ID 15

lysC2: 5'- cctacgaaaggatttttaccggtggccctggctcgtag-3'

20 SEQ ID 16:

lysC6: 5'- gattagtggaacctcgtagtc-3'

25 Die Primer wurden in eine PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA von *C. glutamicum* ATCC13032 lysC^{fb} eingesetzt. Mit diesem Ansatz konnte ein DNA-Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von 1638 bp entsprach.

Die Primer sod1 und ask2 enthalten eine überlappende Sequenz und sind an ihren 5'-Enden homolog zueinander.

30 Die oben erhaltenen PCR-Produkte wurden als Template für eine weitere PCR eingesetzt, in der die folgenden Primer genutzt wurden.

SEQ ID 17:

35 sod4: 5'- gcggcgcaggattttctaa-3'

SEQ ID 18:

lysC4: 5'- tcggttgccctgagtaattgtctt-3'

40 Mit diesem Ansatz konnte ein DNA-Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von 1811 bp entsprach. Diese Psod/lysC-Fusion wurde dann in den Vektor

pCR2.1 (Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) kloniert. In einem weiteren Schritt wurde die Fusion Psod/lysC aus dem Plasmid pCR2.1 (Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) als 1773 bp EcoRI-Fragment in den Integrationsvektor pK19 mob sacB SEQ ID NO 19 kloniert, der zuvor mit der Restriktionsendonuklease EcoRI
5 geschnitten worden war. Das resultierende Plasmid wurde mit pk19 mob sacB Psod lysC bezeichnet.

Zur Amplifikation eines 5'-Bereiches des lysC-Gens wurden folgende Oligonukleotide definiert:

10 SEQ ID 20:

lysC23: 5'-caccgcggctttggacatcactgctac-3'

SEQ ID 21:

lysC24: 5'-cctggggcttttagcggatgcgtctca-3'

15

Die Primer wurden in eine PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA von *C. glutamicum* eingesetzt. Mit diesem Ansatz konnte ein DNA-Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von 674 bp entsprach. Dieses DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) kloniert. Ein 787 bp

20 Spel/XbaI-Fragment wurde dann anschließend in den Vektor pK19 mob sacB Psod lysC kloniert, der zuvor mit dem Restriktionsenzym NheI verdaut worden war. Das resultierende Plasmid wurde mit pK19 mob sacB Psod lysC + US (SEQ ID 22) bezeichnet. Bis zu diesem Schritt wurden alle Klonierungen in *Escherichia coli* XL-1 Blue (Firma Stratagene, Amsterdam, Niederlande) durchgeführt.

25

Mit dem Transformationsplasmid pK19 mobsacB Psod lysC + US wurde dann *E. coli* Mn522 (Firma Stratagene, Amsterdam, Niederlande) zusammen mit dem Plasmid pTc15AcgIM nach Liebl, et al. (1989) FEMS Microbiology Letters 53:299-303 transformiert. Das Plasmid pTc15AcgIM ermöglicht die Methylierung von DNA nach dem
30 Methylierungsmuster von *Corynebacterium glutamicum* (DE 10046870). Durch diesen Schritt wird eine anschließende Elektroporation von *Corynebacterium glutamicum* mit dem Integrationsplasmid pK19 mob sacB Psod lysC + US ermöglicht. Aus dieser Elektroporation und der nachfolgenden Selektion auf CM-Platten mit Kanamycin (25 µg/ml) wurden mehrere Transkonjuganten erhalten. Zur Selektion auf das zweite Re-
35 kombinationereignis, das zur Excision des Vectors samt dem lysC-Promotor und dem lysC-Gen führen soll, wurden diese Transkonjuganten in CM-Medium über Nacht ohne Kanamycin angezogen und anschließend zur Selektion auf CM-Platten mit 10% Saccharose ausplattiert. Das auf dem Vektor pK19 mob sacB vorhandenen sacB-Gen kodiert für das Enzym Laevansucrase und führt bei Wachstum auf Saccharose zur Syn-
40 these von Laevan. Da Laevan für *C. glutamicum* toxisch ist, können nur *C. glutamicum*

Zellen, die das Integrationsplasmid durch den zweiten Rekombinationsschritt verloren haben, auf Saccharose-haltigem Medium wachsen (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174 (1992) 5462-5466). 100 Saccharose-resistente Klone wurden auf ihre Kanamycin-Sensitivität hin überprüft. Für 57 der getesteten Klone konnte neben der Resistenz gegenüber Saccharose auch eine Sensitivität gegenüber Kanamycin nachgewiesen werden. Ob auch der gewünschte Austausch der natürlichen Expressionseinheit durch die Psod-Expressionseinheit erfolgt war, wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) überprüft. Für diese Analyse wurde chromosomale DNA aus dem Ausgangsstamm und 20 Klonen isoliert. Hierzu wurden die jeweiligen Klone mit einem Zahnstocher von der Agarplatte abgenommen und in 100 µl H₂O suspendiert und 10 min bei 95°C aufgeköcht. Jeweils 10 µl der erhaltenen Lösung wurden als Template in die PCR eingesetzt. Als Primer wurden Oligonukleotide verwendet, die zur Psod-Expressionseinheit und dem lysC-Gen homolog sind. Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt gewählt: Vorabdenaturierung: 5 min bei 95°C; Denaturierung 30 sec bei 95°C; Hybridisierung 30 sec bei 55°C; Amplifizierung 2 min bei 72°C; 30 Zyklen; End-Extension 5 min bei 72°C. Im Ansatz mit der DNA des Ausgangsstammes konnte durch Wahl der Oligonukleotide kein PCR-Produkt entstehen. Nur bei Klonen, die durch die 2. Rekombination den Austausch des natürlichen Promotors (PlysC) gegen Psod vollzogen haben, wurde ein Bande mit einer Größe von 340 bp erwartet. Insgesamt waren von den getesteten 20 Klonen 2 Klone positiv.

Beispiel 4

Aspartokinase (lysC) Assay

C. glutamicum Stämme, die entweder eine chromosomale Copy des lysC^{fab}-Gens mit dem natürlichen Promotor oder eine chromosomale Copie des Psod lysC^{fab} Konstruktes enthielten, wurden in MMA-Medium (20 g/l Glucose, 10 g/l (NH₄)₂SO₄, 0,5 g KH₂PO₄, 0,5 g K₂HPO₄, 2,5 g Harnstoff, 5 g NaCl, 400 mg MgSO₄ + 7H₂O, 10 mg FeSO₄ * 7H₂O, MnSO₄ * 6 H₂O, 100 mg L-Leucin, 100 mg L-Cystein, 250 mg Pantothersäure, 5 mg Nicotinamid, 100 µg Biotin, 200 µg Thiamin, 15 g MOPS, pH 6,8) bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 8 angezogen. Die Zellen wurden bei 4°C abzentrifugiert und das zweimal mit kaltem Tris-HCl-Puffer (0,1%, pH 8,0) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in kaltem Tris-HCl-Puffer (0,1%, pH 8,0) aufgenommen und eine OD₆₀₀ von 160 eingestellt. Für den Zellaufschluß wurden 1 ml dieser Zellsuspension in 2 ml Ribolyserröhrchen der Fa. Hybaid überführt und in einem Ribolyser der Fa. Hybaid bei einer Rotationseinstellung von 6,0 dreimal für jeweils 30 sec lysiert. Das Lysat wurde durch 30minütige Zentrifugation bei 15.000 rpm bei 4°C in einer Eppendorfzentrifuge geklärt und der Überstand in ein neues Eppendorfcup überführt. Der Proteingehalt wurde nach Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72:248-254 bestimmt.

Die enzymatische Aktivität der Aspartokinase wurde wie folgt durchgeführt. Reaktionsansätze von 1 ml mit 100 mM Tris-HCl (pH8,0), 10 mM MgCl₂, 600 mM Hydroxylamin-HCl (pH 7,3,0 mit 10 N KOH), 4 mM ATP, 200 mM Aspartat (Natriumsalz) und H₂O ad 1 ml wurden für 10 min bei 30°C inkubiert. Der Test wurde durch Zugabe von dem jeweiligen Proteinlysate gestartet und bei 30°C für 30 min inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 1 ml der Stopplösung (10% Eisenchlorid, 3,3 % Trichloressigsäure, 0,7 N NaCl) zum Reaktionsgemisch hinzugegeben. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde OD₅₄₀ des Überstandes gemessen. 1 Unit entspricht dabei 1 nmol Aspartat Hydroxamat, das pro mg Protein pro Minute gebildet wird.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1a gezeigt.

Tabelle 1a

Stamm	spezifische Aktivität [nmol/mg/min]
ATCC 13032 lysC ^{fbr}	19,35
ATCC 13032 Psod lysC ^{fbr}	41,22

Die Aktivität der Aspartokinase konnte durch die Integration des Psod lysC Konstruktes in das Chromosom verdoppelt werden.

Beispiel 5
Produktion von Lysin

Zur Untersuchung der Auswirkung des Psod lysC Konstruktes auf die Lysin-Produktion wurde der Stamm ATCC13032, ATCC13032 lysC^{fbr} und ATCC13032 Psod lysC^{fbr} auf CM-Platten (10,0 g/L D-glucose, 2,5 g/L NaCl, 2,0 g/L Harnstoff, 10,0 g/L Bacto Pepton (Difco), 5,0 g/L Yeast Extract (Difco), 5,0 g/L Beef Extract (Difco), 22,0 g/L Agar (Difco), autoklaviert (20 min. 121°C)) für 2 Tag bei 30°C angezogen. Anschließend wurden die Zellen von der Platte abgekratzt und in Saline resuspendiert. Für die Hauptkultur wurden 10 ml Medium I und 0,5 g autoklaviertes CaCO₃ (Riedel de Haen) in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit der Zellsuspension bis zu einer OD₆₀₀ von 1,5 beimpft und für 39h auf einem vom Typ Infors AJ118 (Fa. Infors, Bottmingen, Schweiz) bei 220 upm inkubiert. Anschließend wurde die Konzentration des in das Medium ausgeschiedene Lysin bestimmt.

Medium I:
40g/l Saccharose

81

- 60g/l Melasse (auf 100% Zuckergehalt berechnet)
10g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
0.4g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0.6g/l KH_2PO_4
5 0.3mg/l Thiamin*HCl
1mg/l Biotin (aus einer 1 mg/ml steril filtrierten Stammlösung die mit NH_4OH auf pH 8,0 eingestellt wurde)
2mg/l FeSO_4
2mg/l MnSO_4
10 mit NH_4OH auf pH 7,8 eingestellt, autoklaviert (121°C , 20 min).
zusätzlich wird Vitamin B12 (Hydroxycobalamin Sigma Chemicals) aus einer Stammlösung (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, steril filtriert) bis zu einer Endkonzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{l}$ zugegeben

- 15 Die Bestimmung der Aminosäurekonzentration erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie nach Agilent auf einer Agilent 1100 Series LC System HPLC. Eine Vorsäulenderivatisierung mit Ortho-Pthalaldehyd erlaubt die Quantifizierung der gebildeten Aminosäuren, die Auftrennung des Aminosäuregemisch findet auf einer Hypersil AA-Säule (Agilent) statt.
Das Ergebnis der Untersuchung ist in Tabelle 2a dargestellt

20

Tabelle 2a

Stamm	L-Lysin (g/l)
ATCC13032	0
ATCC13032 lysC^{fbr}	10,15
ATCC13032 $\text{Psod lysC}^{\text{fbr}}$	12,67

Beispiel 6

- 25 Herstellung des Vektors pCLiK5MCS

Zunächst wurden Ampicillinresistenz und Replikationsursprung des Vektors pBR322 mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO:23 und SEQ ID NO:24 mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert.

30

SEQ ID NO:23

5'-CCCGGGATCCGCTAGCGGCGCGCCGGCCGGCCCGGTGTGAAATACCGCACA
G-3'

- 35 SEQ ID NO:24

5'-TCTAGACTCGAGCGGCCGCGGCCGCGCCTTTAAATTGAAGACGAAAGGGCCTC
G-3'

5 Neben den zu pBR322 komplementären Sequenzen, enthält der Oligonukleotidprimer
SEQ ID NO:23 in 5'-3' Richtung die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen
SmaI, BamHI, NheI und AscI und der Oligonukleotidprimer SEQ ID NO:24 in 5'-3'
Richtung die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen XbaI, XhoI, NotI und
DraI. Die PCR Reaktion wurde nach Standardmethode wie Innis et al. (PCR Protocols.
A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)) mit PfuTurbo Poly-
10 merase (Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt. Das erhaltene DNA Fragment mit
einer Größe von ungefähr 2,1 kb wurde mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Puri-
fication Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt.
Die stumpfen Enden des DNA-Fragmentes wurden mit dem Rapid DNA Ligation Kit
(Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers miteinander ligiert und
15 der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Clo-
ning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben (1989)), in kompetente
E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid
tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Ampicillin (50µg/ml) haltigen LB
Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

20 Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit
(Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdaus
überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK1.

25 Ausgehend vom Plasmid pWLT1 (Liebl et al., 1992) als Template für eine PCR Reakti-
on wurde mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO:25 und SEQ ID NO:26 eine Ka-
namycin-Resistenzcassette amplifiziert.

30 SEQ ID NO:25:
5'-GAGATCTAGACCCGGGGATCCGCTAGCGGGCTGCTAAAGGAAGCGGA-3'

SEQ ID NO:26
5'-GAGAGGCGCGCCGCTAGCGTGGGCGAAGAACTCCAGCA-3'

35 Neben den zu pWLT1 komplementären Sequenzen, enthält der Oligonukleotidprimer
SEQ ID NO: 25 in 5'-3' Richtung die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen
XbaI, SmaI, BamHI, NheI und der Oligonukleotidprimer SEQ ID NO:26 in 5'-3' Richtung
die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen AscI und NheI. Die PCR Reaktion
wurde nach Standardmethode wie Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and
40 Applications, Academic Press (1990)) mit PfuTurbo Polymerase (Stratagene, La Jolla,

USA) durchgeführt. Das erhaltene DNA Fragment mit einer Größe von ungefähr 1,3 kb wurde mit dem GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Das DNA-Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und Ascl (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten und im Anschluß daran erneut mit dem GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Der Vektor pCLiK1 wurde ebenfalls mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und Ascl geschnitten und mit alkalischer Phosphatase (I (Roche Diagnostics, Mannheim)) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde der linearisierte Vektor (ca. 2,1kb) mit dem GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers mit dem geschnittenen PCR Fragment ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Ampicillin (50µg/ml) und Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdaus überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK2.

Der Vektor pCLiK2 wurde mit der Restriktionsendonuklease DraI (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde ein ca. 2,3 kb großes Vektorfragment mit dem GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers religiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdaus überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK3.

Ausgehend vom Plasmid pWLQ2 (Liebl et al., 1992) als Template für eine PCR Reaktion wurde mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO:27 und SEQ ID NO:28 der Replikationsursprung pHM1519 amplifiziert.

5 SEQ ID NO:27:

5'-GAGAGGGCGGCCGCGCAAAGTCCCGCTTCGTGAA-3'

SEQ ID NO:28:

5'-GAGAGGGCGGCCGCTCAAGTCGGTCAAGCCACGC-3'

10

Neben den zu pWLQ2 komplementären Sequenzen, enthalten die Oligonukleotidprimer SEQ ID NO:27 und SEQ ID NO:28 Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease NotI. Die PCR Reaktion wurde nach Standardmethode wie Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)) mit PfuTurbo Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt. Das erhaltene DNA Fragment mit einer Größe von ungefähr 2,7 kb wurde mit dem GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Das DNA-Fragment wurde mit der Restriktionsendonuklease NotI (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten und im Anschluß daran erneut mit dem GFXTMPCR,

15

20

DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Der Vektor pCLiK3 wurde ebenfalls mit der Restriktionsendonuklease NotI geschnitten und mit alkalischer Phosphatase (I (Roche Diagnostics, Mannheim)) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde der linearisierte Vektor (ca. 2,3kb) mit dem

25

GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers mit dem geschnittenen PCR Fragment ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

30

35 Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdaus überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK5.

Für die Erweiterung von pCLiK5 um eine „multiple cloning site“ (MCS) wurden die beiden synthetischen, weitestgehend komplementären Oligonukleotide SEQ ID NO:29 und SEQ ID NO:30, die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen SwaI, XhoI, AatI, ApaI, Asp718, MluI, NdeI, SpeI, EcoRV, SalI, ClaI, BamHI, XbaI und SmaI enthalten, durch gemeinsames Erhitzen auf 95°C und langsames Abkühlen zu einem doppelsträngigen DNA-Fragment vereinigt.

SEQ ID NO:29:

5'-TCGAATTTAAATCTCGAGAGGCCTGACGTCGGGCCCCGGTACCACGCGTCATAT
GACTAGTTCGGACCTAGGGATATCGTTCGACATCGATGCTCTTCTGCGTTAATTAAC
AATTGGGATCCTCTAGACCCGGGATTAAAT-3'

SEQ ID NO:30:

5'-GATCATTTAAATCCCGGGTCTAGAGGATCCCAATTGTTAATTAACGCAGAAGAG
CATCGATGTCGACGATATCCCTAGGTCCGAAGTTCATATGACGCGTGGTACCG
GGCCCGACGTCAGGCCTCTCGAGATTAAAT-3'

Der Vektor pCLiK5 wurde mit den Restriktionsendonuklease XhoI und BamHI (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten und mit alkalischer Phosphatase (I (Roche Diagnostics, Mannheim)) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde der linearisierte Vektor (ca. 5,0 kb) mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers mit dem synthetischen Doppelsträngigen DNA-Fragment ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdaus überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK5MCS.

Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzierungsreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.

Das entstandene Plasmid pCLiK5MCS ist als SEQ ID NO:31 aufgeführt.

Beispiel 7

Herstellung des Plasmids PmetA metA

5

Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde nach Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 oder Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828 präpariert. Mit den Oligonukleotidprimer SEQ ID NO 32 und SEQ ID NO 33, der chromosomalen DNA als Template und Pfu Turbo Polymerase (Fa. Stratagene) wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Standardmethoden, wie in Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press beschrieben, ein das metA Gen inklusive des nichtkodierenden 5'-Bereichs amplifiziert.

10

SEQ ID NO 32

15

5'-GCGCGGTACCTAGACTCACCCCAGTGCT -3'

und

SEQ ID NO 33

5'-CTCTACTAGTTTAGATGTAGAACTCGATGT -3'

20

Das erhaltene DNA Fragment von ca. 1,3 kb Größe wurde mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Im Anschluß daran wurde es mit den Restriktionsenzymen Asp718 und SpeI (Roche Diagnostics, Mannheim) gespalten und das DNA Fragment mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit aufgereinigt.

25

Der Vektor pCLiK5MCS SEQ ID NO: 31 wurde mit den Restriktionsenzymen Asp718 und SpeI geschnitten und ein 5 kb großes Fragment nach elektrophoretischer Auftrennung mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit isoliert.

30

Das Vektorfragment wurde zusammen mit dem PCR-Fragment mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente *E.coli* XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

35

Die Präparation der Plasmid DNA wurde nach Methoden und mit Materialien der Fa. Qiagen durchgeführt. Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt.

40

Die Sequenzierungsreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.

5 Das entstandene Plasmid pCLiK5MCS PmetA metA ist als SEQ ID NO 34: aufgeführt.

Beispiel 8

Herstellung des Plasmids pCLiK5MCS Psod metA

- 10 Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde nach Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 oder Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828 präpariert. Mit den Oligonukleotidprimer SEQ ID NO 35 und SEQ ID NO 36, der chromosomalen DNA als Template und Pfu Turbo Polymerase (Fa. Stratagene) wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Standardmethoden wie Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press ein DNA Fragment von ca. 200 Basenpaaren aus dem nichtkodierenden 5'-Bereich (Region der Expressionseinheit) der Superoxiddismutase (Psod) amplifiziert.

SEQ ID NO 35

- 20 5'-GAGACTCGAGAGCTGCCAATTATTCCGGG-3'
und

SEQ ID NO 36

5'-CCTGAAGGCGCGAGGGTGGGCATGGGTAAAAAATCCTTTTCG -3'

- 25 Das erhaltene DNA Fragment wurde mit dem GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

- 30 Ausgehend vom Plasmid PmetA metA SEQ ID 34 als Template für eine PCR Reaktion wurde mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO 37: und SEQ ID NO 38: ein Teil von metA amplifiziert.

SEQ ID NO 37

5'-CCCACCCTCGCGCCTTCAG -3'

und

- 35 SEQ ID NO 38

5'-CTGGGTACATTGCGGCCC -3'

- 40 Das erhaltene DNA Fragment von ungefähr 470 Basenpaaren wurde mit dem GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit nach Angaben des Herstellers gereinigt.

- In einer weiteren PCR Reaktion wurden die beiden oben erhaltenen Fragmente gemeinsam als Template eingesetzt. Durch die mit dem Oligonukleotidprimer SEQ ID NO: 36 eingebrachten, zu metA homologen Sequenzen, kommt es im Zuge der PCR-Reaktion zu einer Anlagerung beider Fragmente aneinander und einer Verlängerung zu einem durchgehenden DNA-Strang durch die eingesetzte Polymerase. Die Standardmethode wurde dahingehend modifiziert, dass die verwendeten Oligonukleotidprimer SEQ ID NO: 35 und SEQ ID NO: 38 erst mit Beginn des 2. Zykluses dem Reaktionsansatz zugegeben wurden.
- Das amplifizierte DNA Fragment von ungefähr 675 Basenpaaren wurde mit dem GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit nach Angaben des Herstellers gereinigt. Im Anschluß daran wurde es mit den Restriktionsenzymen XhoI und NcoI (Roche Diagnostics, Mannheim) gespalten und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das ca. 620 Basenpaar große DNA Fragment mit GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) aus der Agarose aufgereinigt. Das Plasmid PmetA metA SEQ ID NO 34: wurde mit den Restriktionsenzymen NcoI und SpeI (Roche Diagnostics, Mannheim) gespalten. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurde ein ca. 0,7 kb großes metA Fragment mit GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit aus der Agarose aufgereinigt.
- Der Vektor pClik5MCS SEQ ID NO: 31 wurde mit den Restriktionsenzymen XhoI und SpeI (Roche Diagnostics, Mannheim) geschnitten und ein 5 kb großes Fragment nach elektrophoretischer Auftrennung mit GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit isoliert.
- Das Vektorfragment wurde zusammen mit dem PCR-Fragment und dem metA-Fragment mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.
- Die Präparation der Plasmid DNA wurde nach Methoden und mit Materialien der Fa. Quiagen durchgeführt. Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzierreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.

Das entstandene Plasmid pCLiK5MCS PSODmetA ist als SEQ ID NO 39: aufgeführt.

Beispiel 9

MetA-Aktivitäten

5

Der Stamm *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 wurde jeweils mit den Plasmiden pClik5 MCS, pClik MCS PmetA metA, pCLiK5MCS Psod metA, nach der beschriebenen Methode (Liebl, et al. (1989) FEMS Microbiology Letters 53:299-303) transformiert. Die Transformationsmischung wurde auf CM-Platten plattiert, die zusätzlich 20mg/l Kanamycin enthielten, um eine Selektion auf Plasmid-haltige Zellen zu erreichen. Erhaltene Kan-resistente Klone wurden gepickt und vereinzelt.

10

C. glutamicum Stämme, die eines dieser Plasmidkonstrukte enthielten, wurden in MMA-Medium ((40 g/l Saccharose, 20 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/l KH_2PO_4 , 1 g/l K_2HPO_4 , 0,25g/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 54 g Aces, 1 ml CaCl_2 (10 g/l), 1 ml Protocatechoat (300 mg/10 ml), 1 ml Spurenelementelösung (10 g/l $\text{FeSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 10 g/l $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 2 g/l $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/l CuSO_4 , 0,02 g/l $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$), 100 µg/l Vitamin B₁₂, 0,3 mg/l Thiamin, 1mM Leucin, 1 mg/l Pyridoxal HCl, 1 ml Biotin (100 mg/l), pH7,0) bei 30°C über Nacht angezogen. Die Zellen wurden bei 4°C abzentrifugiert und das zweimal mit kaltem Tris-HCl-Puffer (0,1%, pH 8,0) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in kalten Tris-HCl-Puffer (0,1%, pH 8,0) aufgenommen und eine OD₆₀₀ von 160 eingestellt. Für den Zellaufschluß wurden 1 ml dieser Zellsuspension in 2 ml Ribolyserröhrchen der Fa. Hybaid überführt und in einem Ribolyser der Fa. Hybaid bei einer Rotationseinstellung von 6,0 dreimal für jeweils 30 sec lysiert. Das Lysat wurde durch 30minütige Zentrifugation bei 15.000 rpm bei 4°C in einer Eppendorffzentrifuge geklärt und der Überstand in ein neues Eppendorffcup überführt. Der Proteingehalt wurde nach Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72:248-254 bestimmt.

15

20

25

30

Die Messung der enzymatischen Aktivität von MetA wurde wie folgt durchgeführt. Die Reaktionsansätze von 1 ml enthielten 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5), 5mM MgCl_2 , 100 µM Acetyl CoA, 5mM L-Homoserine, 500 µM DTNB (Ellmans Reagenz) und Zellextrakt. Der Test wurde durch Zugabe von dem jeweiligen Proteinlysate gestartet und bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde dann eine Kinetik bei 412 nm über 10 min aufgenommen.

35

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3a gezeigt.

Tabelle 3a

Stamm	spezifische Aktivität
-------	-----------------------

90

	[nMol/mg/min]
ATCC 13032 pClik5MCS	12,6
ATCC 13032 pClik5MCS PmetA metA	50,7
ATCC 13032 pClik5MCS Psod metA	100,7

Die Aktivität von MetA konnte durch die Verwendung der heterologen Expressionseinheit Psod erheblich gesteigert werden.

Psod-Expressionseinheiten

Zusammenfassung

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Nukleinsäuresequenzen zur Regulation der Transkription und Expression von Genen, die neuen Promotoren und Expressionseinheiten selbst, Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen, Expressionskassetten, enthaltend die Expressionseinheiten, genetisch veränderte Mikroorganismen mit veränderter
- 10 oder verursachter Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate sowie Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten durch Kultivierung der genetisch veränderten Mikroorganismen.

SEQUENCE LISTING

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> Psod-Expressionseinheiten

<130> PF 55185/Mec

<140> 20030320

<141>

<160> 44

<210> 1

<211> 173

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SUPEROXID\DISMUTASE\RXA03119\

<400> 1

ctgccaatt attccgggct tgtgaccgc taccgataa ataggctcggc tgaaaaattt 60
cggttgcaata tcaacaaaaa ggcctatcat tgggaggtgt cgcaccaagt acttttgcga 120
agcgccatct gacggatttt caaaagatgt atatgctcgg tgcggaaacc tac 173

<210> 2

<211> 191

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SUPEROXID\DISMUTASE\RXA03119\

<400> 2

agctgccaat tattccgggc ttgtgaccgc ctaccgata aataggctcgg ctgaaaaatt 60
tcggttgcaat atcaacaaaa aggcctatca ttgggaggtg tcgcaccaag tacttttgcg 120
agcgccatc tgacggattt tcaaaagatg tatatgctcg gtgcggaaac ctacgaaagg 180
attttttacc c 191

<210> 3

<211> 1365

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> RXA00077

<400> 3

atgaatgatg agaattattca aagctccaac tatcagccat tcccagattt tgacgattgg 60
aaacagatcg aggtgtcgct cttagatgtc atcgaatcct cagccattt ttctgatttg 120
aaagatagca ctgatcggtt tgcgtagat gctgcgctag agagagcaaa aagagctgcc 180
gcagttgata ccaatgccat agaaggaatc ttccaaactg atcgcggttt taccataca 240

gttgcaacgc aggtaggggc ttgggagcaa caaatggcga tgaaaggcaa acatgttaag 300
 cctgcgtttg acgatactct agaaggcttt gagtatgttc tcgatgcagt aactggtaga 360
 actccaatct ctcagcaatg gattagaaat ttgcacgccg tcattctgcg gagccaagaa 420
 agccacgagg tttttacagc cgttggagtc caaaatcagg cgcttcagaa aggcgagtat 480
 aaaactcagc caaatagtcc acagcgctca gatggatctg tacatgcata cgccccagtt 540
 gaagatactc ctgctgaaat ggctagattt atttcagaac ttgaatctaa ggaattctta 600
 gcagccgaga aggttattca agctgcctat gccactatg ctttcgtatg tattcatcct 660
 tttgcagatg ggaatggacg agttgcacga gccttggcta gtgtttttct atacaaagat 720
 cctgggtgtcc ctctcgtaat ctaccaagat caacgcagag attacatcca tgctctagaa 780
 gcagcggaca agaataaccc gctcctgctg attagattct ttgctgaacg agtgaccgat 840
 ctattaact ctattatcgt tgatctcact accccgatcg cgggtaaate tggttcggct 900
 aagctttcgg atgcgctacg cccactcgc gtattaccag aattacatga tgctgcacat 960
 aggctccaag aaagtttatt tacagaaatc cgatctcgat tggatgaaga aggaaaaagg 1020
 aatgggttgg agtttctact tcaacggatt tttatcggtt cccattcaa tctgccagag 1080
 ggctataacg ctttccctga tagctattgt ctgaccttag ctttcaatag caactctcca 1140
 aaacaaatct tccacccgct atccatagta atagcagctc gagatgggaa aagagcgagc 1200
 agcgacctcg tggcagctac ttctattgga tacaactttc acgcttacgg acgtgaagtc 1260
 gagcctgttg ttactgaaag ctttcgagaa cgtgtgaaaa tttacgccga cgggattgta 1320
 gatcacttct taaccgaact ggctaaaaag tttcaacaga attaa 1365

<210> 4
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 4
 Met Asn Asp Glu Asn Ile Gln Ser Ser Asn Tyr Gln Pro Phe Pro Ser
 1 5 10 15
 Phe Asp Asp Trp Lys Gln Ile Glu Val Ser Leu Leu Asp Val Ile Glu
 20 25 30
 Ser Ser Arg His Phe Ser Asp Leu Lys Asp Ser Thr Asp Arg Ser Ala
 35 40 45
 Leu Asp Ala Ala Leu Glu Arg Ala Lys Arg Ala Ala Val Asp Thr
 50 55 60
 Asn Ala Ile Glu Gly Ile Phe Gln Thr Asp Arg Gly Phe Thr His Thr
 65 70 75 80
 Val Ala Thr Gln Val Gly Ala Trp Glu Gln Gln Met Ala Met Lys Gly

85					90					95					
Lys	His	Val	Lys	Pro	Ala	Phe	Asp	Asp	Thr	Leu	Glu	Gly	Phe	Glu	Tyr
			100					105					110		
Val	Leu	Asp	Ala	Val	Thr	Gly	Arg	Thr	Pro	Ile	Ser	Gln	Gln	Trp	Ile
		115					120					125			
Arg	Asn	Leu	His	Ala	Val	Ile	Leu	Arg	Ser	Gln	Glu	Ser	His	Glu	Val
	130					135					140				
Phe	Thr	Ala	Val	Gly	Val	Gln	Asn	Gln	Ala	Leu	Gln	Lys	Gly	Glu	Tyr
145				150						155					160
Lys	Thr	Gln	Pro	Asn	Ser	Pro	Gln	Arg	Ser	Asp	Gly	Ser	Val	His	Ala
				165					170					175	
Tyr	Ala	Pro	Val	Glu	Asp	Thr	Pro	Ala	Glu	Met	Ala	Arg	Phe	Ile	Ser
			180					185					190		
Glu	Leu	Glu	Ser	Lys	Glu	Phe	Leu	Ala	Ala	Glu	Lys	Val	Ile	Gln	Ala
		195					200					205			
Ala	Tyr	Ala	His	Tyr	Ala	Phe	Val	Cys	Ile	His	Pro	Phe	Ala	Asp	Gly
	210					215					220				
Asn	Gly	Arg	Val	Ala	Arg	Ala	Leu	Ala	Ser	Val	Phe	Leu	Tyr	Lys	Asp
225				230						235					240
Pro	Gly	Val	Pro	Leu	Val	Ile	Tyr	Gln	Asp	Gln	Arg	Arg	Asp	Tyr	Ile
				245					250					255	
His	Ala	Leu	Glu	Ala	Ala	Asp	Lys	Asn	Asn	Pro	Leu	Leu	Leu	Ile	Arg
			260					265					270		
Phe	Phe	Ala	Glu	Arg	Val	Thr	Asp	Thr	Ile	Asn	Ser	Ile	Ile	Val	Asp
		275					280					285			
Leu	Thr	Thr	Pro	Ile	Ala	Gly	Lys	Ser	Gly	Ser	Ala	Lys	Leu	Ser	Asp
	290					295					300				
Ala	Leu	Arg	Pro	Thr	Arg	Val	Leu	Pro	Glu	Leu	His	Asp	Ala	Ala	His
305						310				315					320
Arg	Leu	Gln	Glu	Ser	Leu	Phe	Thr	Glu	Ile	Arg	Ser	Arg	Leu	Asp	Glu
				325					330					335	
Glu	Gly	Lys	Arg	Asn	Gly	Leu	Glu	Phe	Leu	Leu	Gln	Arg	Ile	Phe	Ile
			340					345					350		
Gly	Ser	Pro	Phe	Asn	Leu	Pro	Glu	Gly	Tyr	Asn	Ala	Phe	Pro	Asp	Ser
		355					360					365			
Tyr	Cys	Leu	Thr	Leu	Ala	Phe	Asn	Ser	Asn	Ser	Pro	Lys	Gln	Ile	Phe
	370					375					380				
His	Pro	Leu	Ser	Ile	Val	Ile	Ala	Ala	Arg	Asp	Gly	Lys	Arg	Ala	Ser
385				390						395					400
Ser	Asp	Leu	Val	Ala	Ala	Thr	Ser	Ile	Gly	Tyr	Asn	Phe	His	Ala	Tyr
				405					410					415	
Gly	Arg	Glu	Val	Glu	Pro	Val	Val	Thr	Glu	Ser	Phe	Arg	Glu	Arg	Val

420

425

430

Lys Ile Tyr Ala Asp Gly Ile Val Asp His Phe Leu Thr Glu Leu Ala
435 440 445

Lys Lys Phe Gln Gln Asn
450

<210> 5
<211> 35
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID5

<400> 5
gagagagaga cgcgtcccag tggctgagac gcatc

35

<210> 6
<211> 34
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_6

<400> 6
ctctctctgt cgacgaattc aatcttacgg cctg

34

<210> 7
<211> 4323
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_7

<220>
<221> misc_feature
<222> (457)..(1248)
<223> KanR

<220>
<221> misc_feature
<222> (1515)..(2375)
<223> Ori-EC (pMB)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1515)..(2375)
<223> Ori-EC (pMB) complement

<220>
<221> misc_feature
<222> (2418)..(3839)
<223> SacB complement

<220>
<221> misc_feature

<222> (3840) .. (4302)
<223> PsacB complement

<400> 7

tcgagaggcc tgacgtcggg cccggtacca cgcgtcatat gactagttcg gacctaggga 60
tatcgtcgac atcgatgctc ttctgcgta attaacaatt gggatcctct agacccggga 120
tttaaatacgc tagcgggctg ctaaaggaag cggaaacacgt agaaagccag tccgcagaaa 180
cgggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct ggacaaggga aaacgcaagc 240
gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga ctgggcggtt 300
ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc cctctggtaa ggttgggaag 360
ccctgcaaag taaactggat ggctttcttg ccgccaagga tctgatggcg caggggatca 420
agatctgac aagagacagg atgaggatcg ttctgcatga ttgaacaaga tggattgcac 480
gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca 540
tcggctgct ctgatgccgc cgtgttcggg ctgtcagcgc aggggcgccc ggttcttttt 600
gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc gcggctatcg 660
tggctggcca cgacgggctg tccttgcgca gctgtgctcg acgttgtcac tgaagcggga 720
agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc tcaccttgct 780
cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg 840
gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaaa catcgcacgc agcgagcacg tactcggatg 900
gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc 960
gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcatg cccgacggcg aggatctcgt cgtgacccat 1020
ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatgggtg gaaaatggcc gcttttcttg attcatcgac 1080
tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac ccgtgatatt 1140
ctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg tatcgccgct 1200
cccgattcgc agcgcatcgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg agcgggactc 1260
tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca 1320
ccgccgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc ggctggatga 1380
tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgcca cgctagcggc gcgccggccg 1440
gcccgggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag gcgctcttcc 1500
gcttctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgccggcagc ggtatcagct 1560
cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 1620
tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc 1680
cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 1740
aaccgcagag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct 1800

cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg 1860
gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctgagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag 1920
ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttata cggtaactat 1980
cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 2040
aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac 2100
tacggctaca ctagaaggac agtattttggt atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc 2160
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt 2220
tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 2280
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat tttgggtcatg 2340
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaaagg ccggccgcgg ccgccatcgg 2400
atcttctttt tgcgttttta tttgttaact gttaattgtc cttgttcaag gatgctgtct 2460
ttgacaacag atgttttctt gcctttgatg ttcagcagga agctcggcgc aaacgttgat 2520
tgtttgtctg cgtagaatcc tctgtttgtc atatagcttg taatcacgac attgtttcct 2580
ttcgcttgag gtacagcgaa gtgtgagtaa gtaaaggtta catcgtagg atcaagatcc 2640
atttttaaca caaggccagt tttgttcagc ggcttgtatg ggccagttaa agaattagaa 2700
acataaccaa gcatgtaa atcgttagac gtaatgccgt caatcgtcac ttttgatccg 2760
cgggagtcag tgaacaggta ccatttgccg ttcattttta agacgttcgc gcgttcaatt 2820
tcatctgtta ctgtgttaga tgcaatcagc ggtttcatca cttttttcag tgtgtaatca 2880
tcgttttagct caatcatacc gagagcgccg tttgctaact cagccgtgcg ttttttatcg 2940
ctttgcagaa gtttttgact ttcttgacgg aagaatgatg tgcttttgcc atagtatgct 3000
tggttaaata aagattcttc gccttggtag ccatcttcag ttccagtgtt tgcttcaa at 3060
actaagtatt tgtggccttt atcttctacg tagtgaggat ctctcagcgt atggttgctg 3120
cctgagctgt agttgccttc atcgatgaac tgctgtacat tttgatacgt ttttccgtca 3180
ccgtcaaaga ttgatttata atcctctaca ccgttgatgt tcaaagagct gtctgatgct 3240
gatacgttaa cttgtgcagt tgtcagtgtt tgtttgccgt aatgtttacc ggagaaatca 3300
gtgtagaata aacggatttt tccgtcagat gtaaagtgtg ctgaacctga ccattcttgt 3360
gtttggtctt ttaggataga atcatttgca tcgaatttgt cgctgtcttt aaagacgcgg 3420
ccagcgtttt tccagctgtc aatagaagtt tcgccgactt tttgatagaa catgtaaatc 3480
gatgtgtcat ccgcattttt aggatctccg gctaatacaa agacgatgtg gtagccgtga 3540
tagtttgca cagtgccgtc agcgttttgt aatggccagc tgtcccaaac gtccaggcct 3600
tttgcagaag agatattttt aattgtggac gaatcaaatt cagaaacttg atatttttca 3660

ttttttttgcgt gttcagggat ttgcagcata tcatggcgtg taatatggga aatgccgtat 3720
 gtttccttat atggccttttg gttcgtttct ttcgcaaacg cttgagttgc gcctcctgcc 3780
 agcagtgcgg tagtaaaggt taatactgtt gcttgttttg caaacttttt gatgttcattc 3840
 gttcatgtct ccttttttat gtactgtgtt agcgggtctgc ttcttccagc cctcctgttt 3900
 gaagatggca agttagttac gcacaataaa aaaagaccta aaatatgtaa ggggtgacgc 3960
 caaagtatac actttgccct ttacacattt taggtcttgc ctgctttatc agtaacaaac 4020
 cgcgcgcgatt tacttttcga cctcattcta ttagactctc gtttggattg caactgggtct 4080
 attttcctct tttgtttgat agaaaatcat aaaaggattt gcagactacg ggcctaaaga 4140
 actaaaaaat ctatctgttt cttttcattc tctgtatttt ttatagtttc tgttgcattgg 4200
 gcataaagtt gcctttttta tcacaattca gaaaatatca taatatctca tttcactaaa 4260
 taatagtga cggcaggtat atgtgatggg ttaaaaagga tcggcggccg ctcgatttaa 4320
 ttc

4323

<210> 8
 <211> 5860
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <223> PCIS\LYSC

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (155)..(1420)
 <223> lysC

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1974)..(2765)
 <223> KanR

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3032)..(3892)
 <223> Ori-EC complement

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3913)..(3934)
 <223> sacB downstream complement

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3935)..(5356)
 <223> sacB (Bacillus Subtilis) complement

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5357)..(5819)
 <223> Promotor sacB complement

<400> 8

cccgggtacca cgcgtcccag tggctgagac gcatccgcta aagccccagg aaccctgtgc 60
agaaagaaaa cactcctctg gctaggtaga cacagtttat aaaggtagag ttgagcgggt 120
aactgtcagc acgtagatcg aaagggtgcac aaagggtggcc ctggctcgta agaaatatgg 180
cggttcctcg cttgagagtg cggaacgcat tagaaacgtc gctgaacgga tcgttgccac 240
caagaaggct ggaaatgatg tcgtgggtgt ctgctccgca atgggagaca ccacggatga 300
acttctagaa cttgcagcgg cagtgaatcc cgttccgcca gctcgtgaaa tggatatgct 360
cctgactgct ggtgagcgtg tttctaacgc tctcgtcgcc atggctattg agtcccttgg 420
cgcagaagcc caatctttca cgggctctca ggctgggtgtg ctcaccaccg agcgccacgg 480
aaacgcacgc attgttgatg tcactccagg tcgtgtgcgt gaagcactcg atgagggcaa 540
gatctgcatt gttgctgggt tccagggtgt taataaagaa acccgcgatg tcaccacgtt 600
gggtcgtggt ggttctgaca cactgcagt tgcgttggca gctgctttga acgctgatgt 660
gtgtgagatt tactcggacg ttgaagggtgt gtataccgct gaccgcgca tcgttcctaa 720
tgcacagaag ctggaaaagc tcagcttcga agaaatgctg gaacttgctg ctgttggtc 780
caagattttg gtgctgcgca gtgttgaata cgctcgtgca ttcaatgtgc cacttcgcgt 840
acgctcgtct tatagtaatg atcccggcac tttgattgcc ggctctatgg aggatattcc 900
tgtggaagaa gcagtcctta ccggtgtcgc aaccgacaag tccgaagcca aagtaaccgt 960
tctgggtatt tccgataagc caggcgaggc tgcgaagggt ttccgtgcgt tggctgatgc 1020
agaaatcaac attgacatgg ttctgcagaa cgtctcttct gtagaagacg gcaccaccga 1080
catcaccttc acctgccctc gttccgacgg ccgccgcgcg atggagatct tgaagaagct 1140
tcaggttcag ggcaactgga ccaatgtgct ttacgacgac caggtcggca aagtctccct 1200
cgtgggtgct ggcataagt ctcaccaggc tgttaccgca gagttcatgg aagctctgcg 1260
cgatgtcaac gtgaacatcg aattgatttc cacctctgag attcgtattt ccgtgctgat 1320
ccgtgaagat gatctggatg ctgctgcacg tgcattgcat gagcagttcc agctgggcgg 1380
cgaagacgaa gccgtcgttt atgcaggcac cggacgctaa agtttttaaag gagtagtttt 1440
acaatgacca ccatcgcagt tgttggtgca accggccagg tcggccaggt tatgcgcacc 1500
cttttggaag agcgcaatth cccagctgac actgttcgtt tctttgcttc cccacgttcc 1560
gcaggccgta agattgaatt cgtcgacatc gatgctcttc tgcgttaatt aacaattggg 1620
atcctctaga cccgggattt aaatcgctag cgggctgcta aaggaagcgg aacacgtaga 1680
aagccagtcc gcagaaacgg tgctgacccc ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga 1740
caagggaaaa cgcaagcgca aagagaaagc aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat 1800
agctagactg ggcggtttta tggacagcaa gcgaaccgga attgccagct ggggcgcct 1860

ctggtaaggt tgggaagccc tgcaaagtaa actggatggc tttcttgccg ccaaggatct 1920
gatggcgcag gggatcaaga tctgatcaag agacaggatg aggatcgttt cgcattgattg 1980
aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg 2040
actgggcaca acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagg 2100
ggcgcgccgt tctttttgtc aagaccgacc tgtccgggtgc cctgaatgaa ctgcaggacg 2160
aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga cgggcgttcc ttgcgcagct gtgctcgacg 2220
ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc tattgggcga agtgccgggg caggatctcc 2280
tgtcatctca ccttgctcct gccgagaaag tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc 2340
tgcatacgct tgatccggct acctgcccat tcgaccacca agcgaacat cgcattcgagc 2400
gagcacgtac tcggatggaa gccggctctg tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc 2460
aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gcgcattgcc gacggcgagg 2520
tctcgtcgt gacctatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa aatggccgct 2580
tttctggatt catcgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt 2640
tggctaccgc tgatattgct gaagagcttg gcggcgaatg ggctgaccgc ttctcgtgc 2700
tttacgggat cgcgcctccc gattcgcagc gcattgcctt ctatgcctt cttgacgagt 2760
tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat gaccgaccaa gcgacgcca acctgccatc 2820
acgagatttc gattccaccg ccgccttcta tgaaagggtg ggcttcggaa tcgttttccg 2880
ggacgccggc tggatgatcc tccagcgcgg ggatctcatg ctggagttct tcgcccacgc 2940
tagcggcgcg ccggccggcc cgggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc 3000
gcattcaggc ctcttccgct tcctcgtca ctgactcgt gcgctcggtc gttcggctgc 3060
ggcgagcggc atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata 3120
tcgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg 3180
cggtgctggc gtttttccat aggctccgc ccctgacga gcattcaaaa aatcgacgct 3240
caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccctggaa 3300
gctccctcgt gcgctctcct gttccgacc tgccgcttac cggatacctg tccgccttcc 3360
tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg 3420
aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg 3480
ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggttag acacgactta tcgccactgg 3540
cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggatatg aggcgggtgct acagagttct 3600
tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttgggtatc tgcgctctgc 3660
tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg 3720
ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc 3780

aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt 3840
aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaaggccg 3900
gccgcggccg ccatcgccat tttcttttgc gtttttatth gttaactgtt aattgtcctt 3960
gttcaaggat gctgtctttg acaacagatg ttttcttgcc tttgatgttc agcaggaagc 4020
tcggcgcaaa cgttgattgt ttgtctgcgt agaatcctct gtttgtcata tagcttgtaa 4080
tcacgacatt gtttcctttc gcttgaggta cagcgaagtg tgagtaagta aaggttacat 4140
cgtaggagtc aagatccatt tttaacacaa ggccagtttt gttcagcggc ttgtatgggc 4200
cagttaaaga attagaaaca taaccaagca tgtaaataatc gttagacgta atgccgtcaa 4260
tcgtcatttt tgatccgcgg gagtcagtga acaggtaacca tttgccgttc attttaaaga 4320
cgttcgcgcg ttcaatttca tctgttactg tgtagatgc aatcagcggg ttcatcactt 4380
ttttcagtgt gtaatcatcg tttagctcaa tcataccgag agcgccgttt gctaactcag 4440
ccgtgcgttt tttatcgctt tgcagaagtt tttgactttc ttgacggaag aatgatgtgc 4500
ttttgccata gtatgctttg ttaaataaag attcttgcgc ttggtagcca tcttcagttc 4560
cagtgtttgc ttcaaataact aagtatttgt ggcctttatc ttctacgtag tgaggatctc 4620
tcagcgtatg gttgtgcct gagctgtagt tgccttcac gatgaactgc tgtacatttt 4680
gatacgtttt tccgtcaccg tcaaagattg atttataatc ctctacaccg ttgatgttca 4740
aagagctgtc tgatgctgat acgttaactt gtgcagttgt cagtgtttgt ttgccgtaat 4800
gtttaccgga gaaatcagtg tagaataaac ggatttttcc gtcagatgta aatgtggctg 4860
aacctgacca ttcttgtgtt tggcttttta ggatagaatc atttgcacg aatttgtcgc 4920
tgtcttttaa gacgcggcca gcgtttttcc agctgtcaat agaagtttcg ccgacttttt 4980
atagaacat gtaaatacat gtgtcatccg catttttagg atctccggct aatgcaaaga 5040
cgatgtggta gccgtgatag tttgcgacag tgccgtcagc gttttgtaat ggccagctgt 5100
cccaaacgtc caggcctttt gcagaagaga tatttttaat tgtggacgaa tcaaattcag 5160
aaacttgata tttttcattt ttttgctgtt cagggatthg cagcatatca tggcgtgtaa 5220
tatgggaaat gccgtatgtt tccttatatg gcttttggtt cgthtctttc gcaaacgctt 5280
gagttgcgcc tcctgccagc agtgcggtag taaaggthaa tactgttgct tgttttgcaa 5340
actttttgat gttcatcgth catgtctcct tttttatgta ctgtgttagc ggtctgcttc 5400
ttccagccct cctgtttgaa gatggcaagt tagttacgca caataaaaaa agacctaaaa 5460
tatgtaaggg gtgacgcaa agtatacact ttgcccttta cacattthtag gtcttgctg 5520
ctttatcagt aacaaacccg cgcgattthac ttttcgacct cattctatta gactctcgtt 5580
tggattgcaa ctggtctatt ttcctctttt gtttgataga aaatcataaa aggatttgca 5640

gactacgggc ctaaagaact aaaaaatcta tctgtttctt ttcattctct gtatttttta 5700
tagtttctgt tgcattgggca taaagttgcc tttttaatca caattcagaa aatatcataa 5760
tatctcattt cactaaataa tagtgaacgg caggtatatg tgatgggtta aaaaggatcg 5820
gcggccgctc gatttaaatac tcgagaggcc tgacgtcggg 5860

<210> 9
<211> 38
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_9

<400> 9
cggcaccacc gacatcatct tcacctgccc tcgttccg 38

<210> 10
<211> 38
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_10

<400> 10
cggaacgagg gcaggtgaag atgatgtcgg tgggtgccg 38

<210> 11
<211> 1263
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> LYSC-GEN

<400> 11
tggccctgg tcgtacagaa atatggcggg tcctcgcttg agagtgcgga acgcattaga 60
aacgtcgctg aacggatcgt tgccaccaag aaggctggaa atgatgtcgt ggttgtctgc 120
tccgcaatgg gagacaccac ggatgaactt ctagaacttg cagcggcagt gaatcccgtt 180
ccgccagctc gtgaaatgga tatgctcctg actgctgggtg agcgtatttc taacgctctc 240
gtcgccatgg ctattgagtc ccttggcgca gaagcccaat ctttcacggg ctctcaggct 300
ggtgtgctca ccaccgagcg ccacggaaac gcacgcattg ttgatgtcac tccaggctcg 360
gtgcgtgaag cactcgatga gggcaagatc tgcattgttg ctggtttcca ggggtgttaat 420
aaagaaaccc gcgatgtcac cacgttgggt cgtgggtgggt ctgacaccac tgcagttgcg 480
ttggcagctg ctttgaacgc tgatgtgtgt gagatttact cggacgttga cgggtgtgtat 540
accgctgacc cgcgcatcgt tcctaatacga cagaagctgg aaaagctcag cttcgaagaa 600
atgctggaac ttgctgctgt tggctccaag attttgggtgc tgcgcagtgt tgaatacgt 660

cgtgcattca atgtgccact tcgcgtacgc tcgtcttata gtaatgatcc cggcactttg 720
 attgccgggt ctatggagga tattcctgtg gaagaagcag tccttaccgg tgtcgcaacc 780
 gacaagtccg aagccaaagt aaccgttctg ggtatttccg ataagccagg cgaggctgcg 840
 aagggtttcc gtgcgttggc tgatgcagaa atcaacattg acatggttct gcagaacgtc 900
 tcttctgtag aagacggcac caccgacatc accttcacct gccctcgttc cgacggccgc 960
 cgcgcgatgg agatcttgaa gaagcttcag gttcagggca actggaccaa tgtgctttac 1020
 gacgaccagg tcggcaaagt ctccctcgtg ggtgctggca tgaagtctca cccaggtgtt 1080
 accgcagagt tcatggaagc tctgcgcgat gtcaacgtga acatcgaatt gatttccacc 1140
 tctgagattc gtatttccgt gctgatccgt gaagatgatc tggatgctgc tgcacgtgca 1200
 ttgcatgagc agttccagct gggcggcgaa gacgaagccg tcgtttatgc aggcaccgga 1260
 gc 1263

<210> 12
 <211> 5860
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <223> PCIS\LYSC\THR311ILE

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (155)..(1420)
 <223> LysC

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1974)..(2765)
 <223> KanR

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3032)..(3892)
 <223> Ori-EC (pMB)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3913)..(3934)
 <223> C_region : sacB downstream (complement)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3935)..(5356)
 <223> sacB Bacillus Subtilis (complement)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5357)..(5819)
 <223> Promotor sacB (complement)

<400> 12

cccgggtacca cgcgtcccag tggctgagac gcatccgcta aagccccagg aaccctgtgc 60
agaaagaaaa cactcctctg gctaggtaga cacagtttat aaaggtagag ttgagcgggt 120
aactgtcagc acgtagatcg aaaggtgcac aaaggtggcc ctggctcgta agaaatatgg 180
cggttcctcg cttgagagtg cggaacgcat tagaaacgtc gctgaacgga tcgttgccac 240
caagaaggct ggaaatgatg tcgtggttgt ctgctccgca atgggagaca ccacggatga 300
acttctagaa cttgcagcgg cagtgaatcc cgttccgcca gctcgtgaaa tggatatgct 360
cctgactgct ggtgagcgtg tttctaacgc tctcgtcgcc atggctattg agtcccttgg 420
cgcagaagcc caatctttca cgggctctca ggctgggtgtg ctcaccaccg agcgccacgg 480
aaacgcacgc attgttgatg tcactccagg tcgtgtgcgt gaagcactcg atgagggcaa 540
gatctgcatt gttgctgggt tccagggtgt taataaagaa acccgcgatg tcaccacgtt 600
gggtcgtggt ggttctgaca ccactgcagt tgcgttggca gctgctttga acgctgatgt 660
cgtgagatt tactcggacg ttgacgggtgt gtataccgct gaccgcgca tcgttcctaa 720
tgcacagaag ctggaaaagc tcagcttcga agaatgctg gaacttgctg ctgttggctc 780
caagattttg gtgctgcgca gtgttgaata cgctcgtgca ttcaatgtgc cacttcgcgt 840
acgctcgtct tatagtaatg atcccggcac tttgattgcc ggctctatgg aggatattcc 900
tgtggaagaa gcagtcctta ccggtgtcgc aaccgacaag tccgaagcca aagtaaccgt 960
tctgggtatt tccgataagc caggcgaggc tgcgaagggt ttccgtgcgt tggctgatgc 1020
agaaatcaac attgacatgg ttctgcagaa cgtctcttct gtagaagacg gcaccaccga 1080
catcatcttc acctgccctc gttccgacgg ccgccgcgcg atggagatct tgaagaagct 1140
tcaggttcag ggcaactgga ccaatgtgct ttacgacgac caggtcggca aagtctccct 1200
cgtgggtgct ggcatgaagt ctcaccacag tgttaccgca gagttcatgg aagctctgcg 1260
gatgtcaac gtgaacatcg aattgatttc cacctctgag attcgtattt ccgtgctgat 1320
ccgtgaagat gatctggatg ctgctgcacg tgcattgcat gagcagttcc agctgggcgg 1380
cgaagacgaa gccgtcgttt atgcaggcac cggacgctaa agtttttaaag gagtagtttt 1440
acaatgacca ccatcgcagt tgttggtgca accggccagg tcggccagggt tatgcgcacc 1500
cttttggaag agcgcaattt ccagctgac actgttcgtt tctttgcttc ccacgttcc 1560
gcaggccgta agattgaatt cgtcgacatc gatgctcttc tgcgttaatt aacaattggg 1620
atcctctaga cccgggattt aaatcgctag cgggctgcta aaggaagcgg aacacgtaga 1680
aagccagtcc gcagaaacgg tgctgacccc ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga 1740
caagggaaaa cgcaagcgca aagagaaagc aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat 1800
agctagactg ggcggtttta tggacagcaa gcgaaccgga attgccagct ggggcgcctt 1860
ctggtaagggt tgggaagccc tgcaaagtaa actggatggc tttcttgccg ccaaggatct 1920

gatggcgagcag gggatcaaga tctgatcaag agacaggatg aggatcgttt cgcattgattg 1980
aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg 2040
actgggcaca acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagg 2100
ggcgcccggt tctttttgtc aagaccgacc tgtccgggtgc cctgaatgaa ctgcaggacg 2160
aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga cgggcggttc ttgcgcagct gtgctcgacg 2220
ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc tattgggcga agtgccgggg caggatctcc 2280
tgtcatctca ccttgctcct gccgagaaag tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc 2340
tgcatacgct tgatccggct acctgcccac tcgaccacca agcgaaacat cgcattcgagc 2400
gagcacgtac tcggatggaa gccgggtcttgc tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc 2460
aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gcgcattgcc gacggcgagg 2520
tctcgtcgt gacctatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa aatggccgct 2580
tttctggatt catcgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt 2640
tggctacccg tgatattgct gaagagcttg gcggcgaaatg ggctgaccgc ttcctcgtgc 2700
tttacggtat cgcgcctccc gattcgcagc gcatcgctt ctatcgctt cttgacgagt 2760
tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat gaccgaccaa gcgacgcca acctgccatc 2820
acgagatttc gattccaccg ccgccttcta tgaaagggtg ggcttcggaa tcgttttccg 2880
ggacgccggc tggatgatcc tccagcgcgg ggatctcatg ctggagttct tcgcccacgc 2940
tagcggcgcg ccggccggcc cgggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc 3000
gcatcaggcg ctcttccgct tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc 3060
ggcgagcggg atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata 3120
cgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg 3180
cggtgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct 3240
caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccctggaa 3300
gtccctcgt gcgctctcct gttccgacce tgccgcttac cggatacctg tccgccttcc 3360
tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg 3420
aggctcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaacccc cgttcagccc gaccgctgcg 3480
ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggttaag acacgactta tcgccactgg 3540
cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggatatg aggcgggtgct acagagttct 3600
tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc 3660
tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg 3720
ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc 3780

aagaagatcc ttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt 3840
aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaaggccg 3900
gccgcggccg ccatcggcac tttcttttgc gtttttattt gttaactgtt aattgtcctt 3960
gttcaaggat gctgtctttg acaacagatg ttttcttgcc tttgatgttc agcaggaagc 4020
tcggcgcaaa cggtgattgt ttgtctgcgt agaatcctct gtttgtcata tagcttgtaa 4080
tcacgacatt gtttcctttc gcttgaggta cagcgaagtg tgagtaagta aaggttacat 4140
cgtaggatac aagatccatt tttaacacaa ggccagtttt gttcagcggc ttgtatgggc 4200
cagttaaaga attagaaaca taaccaagca tgtaaataac gttagacgta atgccgtcaa 4260
tcgtcatttt tgatccgcgg gagtcagtga acaggtaacca tttgccgttc attttaaaga 4320
cgttcgcgcg ttcaatttca tctgttactg tgtagatgc aatcagcggg ttcattcactt 4380
ttttcagtgt gtaatcatcg tttagctcaa tcataccgag agcgccgttt gctaactcag 4440
cggtgcgttt tttatcgctt tgcagaagtt tttgactttc ttgacggaag aatgatgtgc 4500
ttttgccata gtatgctttg ttaaataaag attcttcgcc ttggtagcca tcttcagttc 4560
cagtgtttgc ttcaaatact aagtatttgt ggcctttatc ttctacgtag tgaggatctc 4620
tcagcgtatg gttgtcgcct gagctgtagt tgccttcacg gatgaactgc tgtacatttt 4680
gatacgtttt tccgtcacccg tcaaagattg atttataatc ctctacaccg ttgatgttca 4740
aagagctgtc tgatgctgat acgttaactt gtgcagttgt cagtgtttgt ttgccgtaat 4800
gtttaccgga gaaatcagtg tagaataaac ggatttttcc gtcagatgta aatgtggctg 4860
aacctgacca ttcttgtgtt tgggtctttta ggatagaatc atttgcacg aatttgtcgc 4920
tgtctttaaa gacgcggcca gcgtttttcc agctgtcaat agaagtttcg ccgacttttt 4980
gatagaacat gtaaatacgat gtgtcatccg catttttagg atctccggct aatgcaaaga 5040
gatgtggta gccgtgatag tttgcgacag tgccgtcagc gttttgtaat ggccagctgt 5100
cccaaacgtc caggcctttt gcagaagaga tatttttaat tgtggacgaa tcaaattcag 5160
aaacttgata tttttcattt ttttgctgtt cagggatttg cagcatatca tggcgtgtaa 5220
tatgggaaat gccgtatgtt tccttatatg gcttttggtt cgtttctttc gcaaacgctt 5280
gagttgcgcc tcctgccagc agtgcggtag taaaggttaa tactgttgct tgttttgcaa 5340
actttttgat gttcatcggt catgtctcct tttttatgta ctgtgttagc ggtctgcttc 5400
ttccagccct cctgtttgaa gatggcaagt tagttacgca caataaaaaa agacctaaaa 5460
tatgtaaggg gtgacgcaa agtatacact ttgcccttta cacatttttag gtcttgccctg 5520
ctttatcagt aacaaacccg cgcgatttac ttttcgacct cattctatta gactctcggt 5580
tggttgcaa ctggtctatt ttctctttt gtttgataga aaatcataaa aggatttgca 5640
gactacgggc ctaaagaact aaaaaatcta tctgtttctt ttcattctct gtatttttta 5700

tagtttctgt tgcattgggca taaagttgcc tttttaatca caattcagaa aatatcataa 5760

tatctcattt cactaaataa tagtgaacgg caggtatatg tgatgggtta aaaaggatcg 5820

gcggccgctc gatttaaatac tcgagaggcc tgacgtcggg 5860

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SOD8

<400> 13

accctggcgg aaaccctgag tcg 23

<210> 14

<211> 65

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SOD1

<400> 14

tacgaccagg gccacgggta aaaaatcctt tcgtaggttt ccgcaccgag catatacatc 60

ttttg 65

<210> 15

<211> 40

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> LYSC2

<400> 15

cctacgaaag gattttttac ccgtggccct ggtcgtacag 40

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> LYSC6

<400> 16

gattagtgga acctcgtcgt c 21

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SOD4

<400> 17

gcggcgcagg attttctaa

19

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> LYSC4

<400> 18

tcggttgcct gagtaatgtc tt

22

<210> 19

<211> 5720

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> PK19

<220>

<221> misc_feature

<222> (2706)..(3968)

<223> lysC complement

<220>

<221> misc_feature

<222> (3969)..(4166)

<223> Psod complement

<220>

<221> misc_feature

<222> (4538)..(5236)

<223> 5' lysC complement

<220>

<221> misc_feature

<222> (5626)..(6420)

<223> KanR

<220>

<221> misc_feature

<222> (6449)..(6911)

<223> PsacB

<220>

<221> misc_feature

<222> (6912)..(6)

<223> sacB

<400> 19

ggtcgactct agaggatccc cgggtaccga gctcgaattc actggccgtc gttttacaac 60

gtcgtgactg ggaaaaccct ggcgttacc aacttaatcg ccttgcagca catccccctt 120

tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg cccttcccaa cagttgcgca 180

gcctgaatgg cgaatggcga taagctagct tcacgctgcc gcaagcactc agggcgcaag 240
ggctgctaaa ggaagcggaa cacgtagaaa gccagtccgc agaaacgggtg ctgacccccgg 300
atgaatgtca gctactgggc tatctggaca agggaaaacg caagcgcaaa gagaaagcag 360
gtagcttgca gtgggcttac atggcgatag ctagactggg cggtttttatg gacagcaagc 420
gaaccggaat tgccagctgg ggcgccctct ggtaagggtg ggaagccctg caaagtaaac 480
tggatggctt tcttgccgcc aaggatctga tggcgaggg gatcaagatc tgatcaagag 540
acaggatgag gatcgtttcg catgattgaa caagatggat tgcacgcagg ttctccggcc 600
gcttgggtgg agaggctatt cggctatgac tgggcacaac agacaatcgg ctgctctgat 660
gccgccgtgt tccggctgtc agcgcagggg cgcgcggttc tttttgtcaa gaccgacctg 720
tccggtgccc tgaatgaact ccaagacgag gcagcgcggc tatcgtggct ggccacgacg 780
gcgttcctt gcgcagctgt gctcgacgtt gtcactgaag cgggaaggga ctggctgcta 840
ttgggcgaag tgccggggca ggatctcctg tcatctcacc ttgctcctgc cgagaaagta 900
tccatcatgg ctgatgcaat gcggcggtg catacgcttg atccggctac ctgcccattc 960
gaccaccaag cgaaacatcg catcgagcga gcacgtactc ggatggaagc cggctctgtc 1020
gatcaggatg atctggacga agagcatcag gggctcgcgc cagccgaact gttcgccagg 1080
ctcaaggcgc ggatgcccga cggcgaggat ctcgctcgtga cccatggcga tgcctgcttg 1140
ccgaatatca tgggtggaaaa tggccgcttt tctggattca tcgactgtgg ccggctgggt 1200
gtggcggacc gctatcagga catagcgttg gctacccgtg atattgctga agagcttggc 1260
ggcgaatggg ctgaccgctt cctcgtgctt tacggtatcg ccgctcccga ttcgcagcgc 1320
atcgcttct atcgcttct tgacgagttc ttctgagcgg gactctgggg ttctgctagag 1380
atcgatcct ttttaaccca tcacatatac ctgccgttca ctattattta gtgaaatgag 1440
atattatgat attttctgaa ttgtgattaa aaaggcaact ttatgcccac gcaacagaaa 1500
ctataaaaaa tacagagaat gaaaagaaac agatagattt tttagttctt taggcccgtg 1560
gtctgcaaat ccttttatga ttttctatca aacaaaagag gaaaatagac cagttgcaat 1620
ccaaacgaga gtctaataga atgaggtcga aaagtaaadc gcgcggggtt gttactgata 1680
aagcaggcaa gacctaaaat gtgtaaaggg caaagtgtat actttggcgt cacccttac 1740
atattttagg tcttttttta ttgtgcgtaa ctaacttgcc atcttcaaac aggagggtg 1800
gaagaagcag accgctaaca cagtacataa aaaaggagac atgaacgatg aacatcaaaa 1860
agtttgcaaa acaagcaaca gtattaacct ttactaccgc actgctggca ggaggcgcaa 1920
ctcaagcgtt tgcgaaagaa acgaacaaaa agccatataa ggaaacatac ggcatttccc 1980
atattacag ccatgatatg ctgcaaatcc ctgaacagca aaaaaatgaa aaatatcaag 2040

tttctgaatt tgattcgtcc acaattaaaa atatctcttc tgcaaaaggc ctggacgttt 2100
gggacagctg gccattacaa aacgctgacg gcactgtcgc aaactatcac ggctaccaca 2160
tcgtctttgc attagccgga gatcctaaaa atgcggatga cacatcgatt tacatgttct 2220
atcaaaaagt cggcgaaact tctattgaca gctggaaaaa cgctggccgc gtcttttaaag 2280
acagcgacaa attcgatgca aatgattcta tcctaaaaga ccaaacacaa gaatggtcag 2340
gttcagccac atttacatct gacggaaaaa tccgtttatt ctacactgat ttctccggta 2400
aacattacgg caaacaacaa ctgacaactg cacaagttaa cgtatcagca tcagacagct 2460
ctttgaacat caacggtgta gaggattata aatcaatctt tgacggtgac ggaaaaacgt 2520
atcaaaatgt acagcagttc atcgatgaag gcaactacag ctcaggcgac aaccatacgc 2580
tgagagatcc tcactacgta gaagataaag gccacaaata cttagtattt gaagcaaaca 2640
ctggaactga agatggctac caaggcgaag aatctttatt taacaaagca tactatggca 2700
aagcacatc attcttccgt caagaaagtc aaaaacttct gcaaagcgat aaaaaacgca 2760
cggctgagtt agcaaacggc gctctcggta tgattgagct aaacgatgat tacacactga 2820
aaaaagtgat gaaaccgctg attgcatcta acacagtaac agatgaaatt gaacgcgcga 2880
acgtctttta aatgaacggc aaatgggtacc tgttcaactga ctcccgcgga tcaaaaatga 2940
cgattgacgg cattacgtct aacgatattt acatgcttgg ttatgtttct aattctttta 3000
ctggcccata caagccgctg aacaaaactg gccttgtgtt aaaaatggat cttgatccta 3060
acgatgtaac ctttacttac tcacacttcg ctgtacctca agcgaaagga aacaatgtcg 3120
tgattacaag ctatatgaca aacagaggat tctacgcaga caaacaatca acgtttgcgc 3180
cgagcttcct gctgaacatc aaaggcaaga aaacatctgt tgtcaaagac agcatccttg 3240
aacaaggaca attaacagtt aacaaataaa aacgcaaaag aaaatgccga tgggtaccga 3300
cgaaatgac cgaccaagcg acgccaacc tgccatcacg agatttcgat tccaccgccg 3360
ccttctatga aaggttgggc ttcggaatcg ttttccggga cgccctcgcg gacgtgctca 3420
tagtccacga cgcccgatg tttgtagccc tggccgacgg ccagcaggta ggccgacagg 3480
ctcatgccgg ccgcgcgcgc cttttcctca atcgctcttc gttcgtctgg aaggcagtac 3540
acctgatag gtgggctgcc cttcctgggt ggcttggttt catcagccat ccgcttgccc 3600
tcatctgtta cgccggcggt agccggccag cctcgcagag caggattccc gttgagcacc 3660
gccaggtgcg aataagggac agtgaagaag gaacacccgc tcgcgggtgg gcctacttca 3720
cctatcctgc ccggctgacg ccgttgata caccaaggaa agtctacacg aaccctttgg 3780
caaaatcctg tatatcgtgc gaaaaaggat ggatataccg aaaaaatcgc tataatgacc 3840
ccgaagcagg gttatgcagc ggaaaagcgc tgcttcctg ctgttttgtg gaatatctac 3900
cgactggaaa caggcaaatg caggaaatta ctgaactgag gggacaggcg agagacgatg 3960

ccaaagagct cctgaaaatc tcgataactc aaaaaatacg cccggtagtg atcttatttc 4020
 attatggtga aagttggaac ctcttacgtg ccgatcaacg tctcattttc gccaaaagtt 4080
 ggcccagggc ttcccgggtat caacagggac accaggattt atttattctg cgaagtgatc 4140
 ttccgtcaca ggtattttatt cggcgcaaag tgcgtcgggt gatgctgcca acttactgat 4200
 ttagtgtatg atggtgtttt tgaggtgctc cagtggcttc tgtttctatc agctcctgaa 4260
 aatctcgata actcaaaaaa tacgcccggg agtgatctta ttctattatg gtgaaagttg 4320
 gaacctctta cgtgccgatc aacgtctcat ttctgccaaa agttggccca gggcttcccg 4380
 gtatcaacag ggacaccagg atttatttat tctgcgaagt gatcttccgt cacaggattt 4440
 tattcggcgc aaagtgcgtc gggtagtgct gccaaacttac tgatttagtg tatgatgggtg 4500
 tttttgaggt gctccagtgg cttctgtttc tatcagggct ggatgatcct ccagcgcggg 4560
 atctcatgc tggagttctt cgcccacccc aaaaggatct aggtgaagat cttttttgat 4620
 aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgtg 4680
 gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa 4740
 acaaaaaaac caccgctacc agcgggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt 4800
 tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgttct tctagtgtag 4860
 ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta 4920
 atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca 4980
 agacgatagt taccggataa ggcgagcggc tcgggctgaa cgggggggttc gtgcacacag 5040
 cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa 5100
 agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggatc cggtaaagcg cagggtcggg 5160
 caggagagc gcacgaggga gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc 5220
 gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc 5280
 ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt 5340
 gctcacatgt tctttcctgc gttatccctt gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt 5400
 gagtgagctg ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag 5460
 gaagcggaag agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa 5520
 tgcagctggc acgacaggtt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat 5580
 gtgagttagc tcactcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg 5640
 ttgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac 5700
 gccaaagctt catgcctgca 5720

<211> 27
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> LYSC23

<400> 20
caccgcgggt ttggacatca ctgctac

27

<210> 21
<211> 26
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> LYSC24

<400> 21
cctgggggctt tagcggatgc gtctca

26

<210> 22
<211> 8324
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> PK19

<220>
<221> misc_feature
<222> (2706)..(3968)
<223> lysC complement

<220>
<221> misc_feature
<222> (3969)..(4166)
<223> Psod complement

<220>
<221> misc_feature
<222> (4538)..(5236)
<223> 5' lysC complement

<220>
<221> misc_feature
<222> (5626)..(6420)
<223> KanR

<220>
<221> misc_feature
<222> (6449)..(6911)
<223> PsacB

<220>
<221> misc_feature
<222> (6912)..(6)
<223> sacB

<400> 22
aaacgcaaaa gaaaatgccg atgggtaccg agcgaaatga ccgaccaagc gacgcccaac 60

ctgccatcac gagatttcga ttccaccgcc gccttctatg aaagggttggg cttcggaate 120
gttttccggg acgccctcgc ggacgtgctc atagtccacg acgcccgta ttttgtagcc 180
ctggccgacg gccagcaggt aggccgacag gctcatgccg gccgccgccg ctttttcctc 240
aatcgctctt cgttcgtctg gaaggcagta caccttgata ggtgggctgc ctttcctggt 300
tggcttggtt tcatcagcca tccgcttgcc ctcatctggt acgccggcgg tagccggcca 360
gcctcgcaga gcaggattcc cgttgagcac cgccagggtgc gaataaggga cagtgaagaa 420
ggaacacccg ctgcggggtg ggccacttc acctatcctg cccggctgac gccgttggt 480
acaccaagga aagtctacac gaaccctttg gcaaaatcct gtatatcgtg cgaaaaagga 540
tggatatacc gaaaaaatcg ctataatgac cccgaagcag ggttatgcag cggaagcgg 600
ctgcttccct gctgttttgt ggaatatcta ccgactggaa acaggcaaatt gcaggaaatt 660
ctgaactga ggggacaggc gagagacgat gccaaagagc tcctgaaaat ctcgataact 720
caaaaaatac gcccggtagt gatcttattt cattatgggt aaagttggaa cctcttacgt 780
gccgatcaac gtctcatttt cgccaaaagt tggcccaggg cttcccggta tcaacaggga 840
caccaggatt tatttattct gcgaagtgat cttccgtcac aggtatttat tcggcgcaaa 900
gtgcgtcggg tgatgctgcc aacttactga tttagtgtat gatgggtgtt ttgaggtgct 960
ccagtggctt ctgtttctat cagctcctga aaatctogat aactcaaaaa atacgcccg 1020
tagtgatctt atttcattat ggtgaaagtt ggaacctctt acgtgccgat caacgtctca 1080
ttttcgccaa aagttggccc agggcttccc ggtatcaaca gggacaccag gatttattta 1140
ttctgcgaag tgatcttccg tcacagggtat ttattcggcg caaagtgcgt cgggtgatgc 1200
tgccaactta ctgatttagt gtatgatggt gtttttgagg tgctccagtg gcttctgttt 1260
tatcagggc tggatgatcc tccagcgcg ggtatctcatg ctggagttct tcgcccaccc 1320
caaaaggatc taggtgaaga tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga 1380
gttttcgttc cactgagcgt cagaccccg agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc 1440
ttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgg 1500
ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc 1560
gcagatacca aatactgttc ttctagtgt ggcgtagtta ggccaccact tcaagaactc 1620
tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg 1680
cgataagtcg tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg 1740
gtcgggctga acgggggggt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga 1800
actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc 1860
ggacagggtat ccggtaaagc gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg 1920

gggaaacgcc tggatatcttt atagtcctgt cggggtttcgc cacctctgac ttgagcgctcg 1980
 atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt 2040
 ttacgggttc ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc 2100
 tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt tgagttagct gataccgctc gccgcagccg 2160
 aacgaccgag cgcagcgagt cagttagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc 2220
 gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta atgcagctgg cacgacaggt ttcccgactg 2280
 gaaagcgggc agtgagcgca acgcaattaa tgtgagttag ctcactcatt aggcacccca 2340
 ggctttacac tttatgcttc cggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt 2400
 tcacacagga aacagctatg accatgatta cgccaagctt gcatgcctgc aggtcgactc 2460
 tagaggatcc ccgggtaccg agctcgaatt cgccctttcg gttgcctgag taatgtcttc 2520
 tacctcgatt tccgtgccac ggaattcaat cttacggcct gcggaacgtg gggaagcaaa 2580
 aaacgaaca gtgtcagctg ggaaattgcg ctcttccaaa aggggtgcgc taacctggcc 2640
 gacctggccg gttgcaccaa caactgcgat ggtggtcatt gtaaaactac tcctttaaaa 2700
 ctttagcgtc cggtgccctgc ataaacgacg gcttcgtctt cgccgccag ctggaactgc 2760
 tcatgcaatg cacgtgcagc agcatccaga tcatcttcac ggatcagcac ggaaatacga 2820
 atctcagagg tggaaatcaa ttcgatgttc acgttgacat cgcgcagagc ttccatgaac 2880
 tctgcggtaa cacctgggtg agacttcatg ccagcaccca cgagggagac tttgccgacc 2940
 tggtcgtcgt aaagcacatt ggtccagttg ccctgaacct gaagcttctt caagatctcc 3000
 atcgcgcggc ggccgtcggg acgagggcag gtgaagatga tgtcgggtgt gccgtcttct 3060
 acagaagaga cgttctgcag aaccatgtca atgttgattt ctgcatcagc caacgcacgg 3120
 aaaaccttcg cagcctcgcc tggcttatcg gaaataccca gaacggttac tttggcttcg 3180
 acttgtcgg ttgcgacacc ggtaaggact gcttcttcca caggaatctc ctccatagag 3240
 ccggcaatca aagtgccggg atcattacta taagacgagc gtacgcgaag tggcacattg 3300
 aatgcacgag cgtattcaac actgcgcagc accaaaatct tggagccaac agcagcaagt 3360
 tccagcattt cttcgaagct gagcttttcc agcttctgtg cattaggaac gatgcgcggg 3420
 tcagcggtat acacaccgtc aacgtccgag taaatctcac acacatcagc gttcaaagca 3480
 gctgccaacg caactgcagt ggtgtcagaa ccaccacgac ccaacgtggg gacatcgcg 3540
 gtttctttat taacaccctg gaaaccagca acaatgcaga tcttgccctc atcgagtgt 3600
 tcacgcacac gacctggagt gacatcaaca atgcgtgcgt ttccgtggcg ctcggtggtg 3660
 agcacaccag cctgagagcc cgtgaaagat tgggcttctg cgccaaggga ctcaatagcc 3720
 atggcgacga gagcgtaga aatacgctca ccagcagtca ggagcatatc catttcacga 3780
 gctggcggaa cgggattcac tgccgctgca agttctagaa gttcatccgt ggtgtctccc 3840

attgaggagc agacaaccac gacatcattt ccagccttct tgggtggcaac gatccgttca 3900
 gcgacgtttc taatgcgttc cgcactctca agcgaggaac cgccatattt ctgtacgacc 3960
 agggccacgg gtaaaaaatc ctttcgtagg tttccgcacc gagcatatac atcttttgaa 4020
 aatccgtcag atggcgcttc gcaaaagtac ttggtgcgac acctcccaat gataggcctt 4080
 tttgttgata ttgcaacgaa atttttcagc cgacctattt atcgggtagc gggtcacaag 4140
 cccggaataa ttggcagcta agtaggggtt aagggcataa ggcttcctca attttcgaaa 4200
 ggaacattcc tgttatggca tggtttttctg caccggaacc cgtgatgggt accgctgatg 4260
 aggcgcttaa aggtggcagg catcctgttt tagaaaatcc tgcgccgcaa gggcgaattc 4320
 actggccgtc gttttacaac gtcgtgactg ggaaaaccct ggcgttacct aacttaatcg 4380
 ccttgcagca catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg 4440
 ccttcccaa cagttgcgca gcctgaatgg cgaatggcga taagctagat gcatgctcga 4500
 gcggccgcca gtgtgatgga tatctgcaga attcgccctt ggggcttttag cggatgcgtc 4560
 tcagccactg ggacgcgttc caataaacag accatatatt gatattcgat ttaatatattg 4620
 agacaaaagt gacagggtgct acttcgcgag caactcttta gtcaactacc ctgaatcaag 4680
 tgcaaagcaa tctgctcgcc gtgcttttctg ccctagcatc ggcatthaaca atcgcatggg 4740
 gcaccgtggg cagacaccgg atcgcgctcc gcaccccaaa agatgggtcc ctaaggagct 4800
 cacctttact caatgctctg atgacaccga tgtgggtgggc aggcattgagt accgcgatgc 4860
 tggcatattt cttaaaaaca gtagcacttg gtttcggcac cctcttggtg gtgcaaccag 4920
 tgcttgtcct gtcgctgatg ttcacgctgc cgctctcagc acgattcaat ggctaccgac 4980
 tacgccgaac tgaaatcttc tgggctacct tcctcaccgt agccgtgggc atcatgatcg 5040
 cttgggacg ccccttccc ggaaaccccc accccactc gatcgatgga ttccagtact 5100
 tttagtcggc gttgcagtaa tgggtggaat gtggctgctt gcggaatacg tattaagaa 5160
 ggacaaagcc ctcatccttg gtcttgtgac ggggtgcattg tttggctacg tagcagtgat 5220
 gtccaaagcc gcggtgaagg gcgaattcca gcacactggc ggccgttact agcttcacgc 5280
 tgccgcaagc actcagggcg caagggctgc taaaggaagc ggaacacgta gaaagccagt 5340
 ccgcagaaac ggtgctgacc ccggatgaat gtcagctact gggctatctg gacaagggaa 5400
 aacgcaagcg caaagagaaa gcaggtagct tgcagtgggc ttacatggcg atagctagac 5460
 tgggcgggtt tatggacagc aagcgaaccg gaattgccag ctggggcgcc ctctggtaag 5520
 gttgggaagc cctgcaaagt aaactggatg gctttcttgc cgccaaggat ctgatggcgc 5580
 aggggatcaa gatctgatca agagacagga tgaggatcgt ttcgcatgat tgaacaagat 5640
 ggattgcacg caggttctcc ggccgcttgg gtggagaggc tattcggtcga tgactgggca 5700

caacagacaa tcggctgctc tgatgccgcc gtgttccggc tgtcagcgca ggggcgccc 5760
gttctttttg tcaagaccga cctgtccggc gccctgaatg aactccaaga cgaggcagcg 5820
cggctatcgt ggctggccac gacgggcggt ccttgcgag ctgtgctcga cgttgtcact 5880
gaagcgggaa gggactggct gctattgggc gaagtgccgg ggcaggatct cctgtcatct 5940
caccttgctc ctgccgagaa agtatccatc atggctgatg caatgcggcg gctgcatacg 6000
cttgatccgg ctacctgcc attcgaccac caagcgaaac atcgcatcga gcgagcacgt 6060
actcggatgg aagccgggtc tgtcgatcag gatgatctgg acgaagagca tcaggggctc 6120
gcgccagccg aactgttcgc caggctcaag gcgcggatgc ccgacggcga ggatctcgtc 6180
gtgacccatg gcgatgcctg cttgcogaat atcatgggtg aaaatggccg cttttctgga 6240
ttcatcgact gtggccggct ggggtgtggcg gaccgctatc aggacatagc gttggctacc 6300
gtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc gcttcctcgt gctttacggc 6360
tcgccgctc ccgattcgca gcgcacgcc ttctatcgcc ttcttgacga gttcttctga 6420
gcgggactct ggggttcgct agaggatcga tcctttttaa cccatcacat atacctgccg 6480
ttcactatta tttagtgaag tgagatatta tgatattttc tgaattgtga ttaaaaaggc 6540
aactttatgc ccatgcaaca gaaactataa aaaatacaga gaatgaaaag aaacagatag 6600
attttttagt tctttaggcc cgtagtctgc aaatcctttt atgattttct atcaaacaaa 6660
agaggaaaat agaccagttg caatccaaac gagagtctaa tagaatgagg tcgaaaagta 6720
aatcgcgcg gtttggttact gataaagcag gcaagaccta aaatgtgtaa agggcaaagt 6780
gtatactttg gcgtcacccc ttacatatct taggtctttt ttattgtgc gtaactaact 6840
tgccatcttc aaacaggagg gctggaagaa gcagaccgct aacacagtac ataaaaagg 6900
agacatgaac gatgaacatc aaaaagtttg caaaacaagc aacagtatta acctttacta 6960
cgactgct ggcaggaggc gcaactcaag cgtttgcgaa agaaacgaac caaaagccat 7020
ataaggaaac atacggcatt tcccatatta cacgccatga tatgctgcaa atccctgaac 7080
agcaaaaaaa tgaaaaatat caagttcctg aatttgattc gtccacaatt aaaaatatct 7140
cttctgcaaa aggctggac gtttgggaca gctggccatt acaaaacgct gacggcactg 7200
tcgcaaacta tcacggctac cacatcgtct ttgcattagc cggagatcct aaaaatgcgg 7260
atgacacatc gatttacatg ttctatcaaa aagtcggcga aacttctatt gacagctgga 7320
aaaacgctgg ccgcgtcttt aaagacagcg acaaattcga tgcaaatgat tctatcctaa 7380
aagaccaaac acaagaatgg tcaggttcag ccacatttac atctgacgga aaaatcogtt 7440
tattctacac tgatttctcc ggtaaacatt acggcaaaca aacactgaca actgcacaag 7500
ttaacgtatc agcatcagac agctctttga acatcaacgg thtagaggat tataaatcaa 7560
tctttgacgg tgacggaaaa acgtatcaaa atgtacagca gttcatcgat gaaggcaact 7620

acagctcagg cgacaaccat acgctgagag atcctcacta cgtagaagat aaaggccaca 7680
 aatacttagt atttgaagca aacactggaa ctgaagatgg ctaccaaggc gaagaatctt 7740
 tatttaacaa agcatactat ggcaaaagca catcattctt ccgtcaagaa agtcaaaaac 7800
 ttctgcaaag cgataaaaaa cgcacggctg agttagcaaa cggcgctctc ggtatgattg 7860
 agctaaacga tgattacaca ctgaaaaaag tgatgaaacc gctgattgca tctaacacag 7920
 taacagatga aattgaacgc gcgaacgtct ttaaaatgaa cggcaaattg tacctgttca 7980
 ctgactcccg cggatcaaaa atgacgattg acggcattac gtctaacgat atttacatgc 8040
 ttggttatgt ttctaattct ttaactggcc catacaagcc gctgaacaaa actggccttg 8100
 tgttaaaaat ggatcttgat cctaacgatg taacctttac ttactcacac ttcgctgtac 8160
 ctcaagcgaa aggaaacaat gtcgtgatta caagctatat gacaaacaga ggattctacg 8220
 agacaaaca atcaacgttt gcgccgagct tcctgctgaa catcaaaggc aagaaaacat 8280
 ctgttgtcaa agacagcatc cttgaacaag gacaattaac agtt 8324

<210> 23
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <223> SEQ_ID_23

<400> 23
 cccgggatcc gctagcggcg cgccggccgg cccggtgtga aataccgcac ag 52

<210> 24
 <211> 53
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <223> SEQ_ID_24

<400> 24
 tctagactcg agcggccgcg gccggccttt aaattgaaga cgaaagggcc tcg 53

<210> 25
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <223> SEQ_ID_25

<400> 25
 gagatctaga cccggggatc cgctagcggg ctgctaaagg aagcgga 47

<210> 26

<211> 38
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_26

<400> 26
gagaggcgcg ccgctagcgt gggcgaagaa ctccagca 38

<210> 27
<211> 34
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_27

<400> 27
gagagggcgg ccgcgcaaag tcccgttcg tgaa 34

<210> 28
<211> 34
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_28

<400> 28
gagagggcgg ccgctcaagt cggtaagcc acgc 34

<210> 29
<211> 140
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_29

<400> 29
tcgaatttaa atctcgagag gcctgacgtc gggcccggta ccacgcgtca tatgactagt 60
tcggacctag ggatatcgtc gacatcgatg ctcttctgcg ttaattaaca attgggatcc 120
tctagacccg ggatttaa 140

<210> 30
<211> 140
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_30

<400> 30
gatcatttaa atcccgggtc tagaggatcc caattgttaa ttaacgcaga agagcatcga 60
tgtcgacgat atccctaggt ccgaactagt catatgacgc gtggtaccgg gcccgacgtc 120

aggcctctcg agatttaa

140

<210> 31
<211> 5091
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> PCLIK5MCS

<220>
<221> misc_feature
<222> (469)..(1260)
<223> KanR

<220>
<221> misc_feature
<222> (1527)..(2387)
<223> Ori EC pMB (complement)

<220>
<221> misc_feature
<222> (2533)..(3207)
<223> Orf1

<220>
<221> misc_feature
<222> (3541)..(4662)
<223> Rep Protein

<400> 31
tcgatttaaa tctcgagagg cctgacgtcg ggcccgggtac cacgcgtcat atgactagtt 60
cggacctagg gatatcgtcg acatcgatgc tcttctgcgt taattaacaa ttgggatcct 120
ctagaccgga gatttaaatc gctagcgggc tgctaaagga agcgggaacac gtagaaagcc 180
agtccgcaga aacgggtgctg accccgggatg aatgtcagct actgggctat ctggacaagg 240
aaacgcaa gcgcaaagag aaagcaggta gcttgcagtg ggcttacatg gcgatagcta 300
gactgggcgg ttttatggac agcaagcgaa ccggaattgc cagctggggc gccctctggt 360
aaggttggga agccctgcaa agtaaaactgg atggctttct tgccgccaag gatctgatgg 420
cgcaggggat caagatctga tcaagagaca ggatgaggat cgtttcgcat gattgaacaa 480
gatggattgc acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg 540
gcacaacaga caatcggctg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcagggggcg 600
ccggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca 660
gcgcggctat cgtggctggc cacgacgggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgtc 720
actgaagcgg gaagggactg gctgctattg ggcgaagtgc cggggcagga tctcctgtca 780
tctcaccttg ctctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat 840
acgcttgatc cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca 900

cgtactcggg tggagccgg tcttgatgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg 960
ctcgcgccag ccgaactggt cgcagggtc aaggcgcgca tgcccgacgg cgaggatctc 1020
gtcgtgaccc atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct 1080
ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct 1140
acccgtgata ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttcct cgtgctttac 1200
ggtatcgccg ctcccgattc gcagcgcac gccttctatc gccttcttga cgagttcttc 1260
tgagcgggac tctgggggtc gaaatgaccg accaagcgcg gcccaacctg ccatcacgag 1320
atttcgattc caccgccgcc ttctatgaaa ggttgggctt cggaatcgtt ttccgggacg 1380
ccggctggat gatcctccag cgcggggatc tcatgctgga gttcttcgcc cacgctagcg 1440
gcgcgccggc cggcccggtg tgaaataccg cacagatgcg taaggagaaa ataccgcatc 1500
aggcgtctt ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg gctgcggcga 1560
ggtatcag ctactcaaa ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca 1620
ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg 1680
ctggcgtttt tccataggct ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt 1740
cagagggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttccccc tggagctcc 1800
ctcgtgcgct ctctgttcc gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct 1860
tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc 1920
gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgctc agcccgaccg ctgcgcctta 1980
tccggtaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca 2040
gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag 2100
gggtggccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag 2160
agttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaac caccgctggg 2220
agcggtggtt tttttgttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa 2280
gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg 2340
attttgggtca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tctttttaa ggccggccgc 2400
ggccgcgcaa agtcccgtt cgtgaaaatt ttcgtgccgc gtgattttcc gccaaaaact 2460
ttaacgaacg ttcgttataa tgggtgtcatg accttcacga cgaagtacta aaattggccc 2520
gaatcatcag ctatggatct ctctgatgtc gcgctggagt ccgacgcgct cgatgctgcc 2580
gtcgatttaa aaacggtgat cggatttttc cgagctctcg atacgacgga cgcgccagca 2640
tcacgagact gggccagtgc cgcgagcgac ctagaaactc tcgtggcgga tcttgaggag 2700
ctggctgacg agctgcgtgc tcggccagcg ccaggaggac gcacagtagt ggaggatgca 2760
atcagttgcg cctactgcgg tggcctgatt cctccccggc ctgaccgcg aggacggcgc 2820

gcaaaatatt gctcagatgc gtgtcgtgcc gcagccagcc gcgagcgcgc caacaaacgc 2880
cacgccgagg agctggagggc ggctaggtcg caaatggcgc tgggaagtgcg tcccccgagc 2940
gaaattttgg ccatggtcgt cacagagctg gaagcggcag cgagaattat cgcgatcgtg 3000
gcggtgcccc caggcatgac aaacatcgta aatgccgcgt ttcgtgtgcc gtggccgccc 3060
aggacgtgtc agcgcgcgcca ccacctgcac cgaatcggca gcagcgtcgc gcgtcgaaaa 3120
agcgcacagg cggcaagaag cgataagctg cacgaatacc tgaaaaatgt tgaacgcccc 3180
gtgagcggta actcacaggg cgtcggctaa cccccagtcc aaacctggga gaaagcgctc 3240
aaaaatgact ctagcggatt cacgagacat tgacacaccg gcctggaaat tttccgctga 3300
tctgttcgac acccatcccc agctcgcgct gcgatcacgt ggctggacga gcgaagaccg 3360
ccgcgaattc ctcgctcacc tgggcagaga aaatttccag ggcagcaaga cccgcgactt 3420
ccagcgtc tggatcaaag acccggacac ggagaaacac agccgaagtt ataccgagtt 3480
ggttcaaaat cgcttgcccc gtgccagtat gttgctctga cgcacgcgca gcacgcagcc 3540
gtgcttgtcc tggacattga tgtgccgagc caccaggccg gcgggaaaat cgagcacgta 3600
aaccgccgagg tctacgcgat tttggagcgc tgggcacgcc tggaaaaagc gccagcttgg 3660
atcggcgtga atccactgag cgggaaatgc cagctcatct ggctcattga tccggtgtat 3720
gccgcagcag gcatgagcag cccgaatatg gccttgctgg ctgcaacgac cgaggaaatg 3780
accgcgttt tcggcgctga ccaggctttt tcacataggg tgagccgtgg cactgcact 3840
ctccgacgat ccagccgta ccgctggcat gccagcaca atcgcgtgga tcgcctagct 3900
gatcttatgg aggttgctcg catgatctca ggcacagaaa aacctaaaaa acgctatgag 3960
caggagtttt ctagcggacg ggcacgtatc gaagcggcaa gaaaagccac tgcggaagca 4020
agcacttg ccacgcttga agcaagcctg ccgagcgccg ctgaagcgtc tggagagctg 4080
atcgacggcg tccgtgtcct ctggactgct ccagggcgctg ccgcccgtga tgagacggct 4140
tttcgccacg ctttgactgt gggataccag ttaaaagcgg ctggtgagcg cctaaaagac 4200
accaagggtc atcgagccta cgagcgtgcc tacaccgtcg ctcaggcggt cggaggaggc 4260
cgtgagcctg atctgccgcc ggactgtgac cgccagacgg attggccgcg acgtgtgcgc 4320
ggctacgtcg ctaaaggcca gccagtcgtc cctgctcgtc agacagagac gcagagccag 4380
ccgaggcgaa aagctctggc cactatggga agacgtggcg gtaaaaaggc cgcagaacgc 4440
tggaaagacc caaacagtga gtacgcccga gcacagcgag aaaaactagc taagtccagt 4500
caacgacaag ctaggaaagc taaaggaaat cgcttgacca ttgcaggttg gtttatgact 4560
gttgagggag agactggctc gtggccgaca atcaatgaag ctatgtctga atttagcgtg 4620
tcacgtcaga ccgtgaatag agcacttaag gtctgcgggc attgaacttc cacgaggacg 4680

ccgaaagctt cccagtaa at gtgccatctc gtaggcagaa aacgggtccc ccgtaggggc 4740
tctctcttgg cctcctttct aggtcgggct gattgctctt gaagctctct agggggggctc 4800
acaccatagg cagataacgt tccccaccgg ctgcgctcgt aagcgcacaa ggactgctcc 4860
caaagatctt caaagccact gccgcgactg ccttcgcgaa gccttgcccc gcggaaattt 4920
cctccaccga gttcgtgcac acccctatgc caagcttctt tcaccctaaa ttcgagagat 4980
tggtattctta ccgtggaaat tcttcgcaaa aatcggtccc tgatcgccct tgcgacgttg 5040
gcgtcgggtgc cgctgggtgc gcttggcttg accgacttga tcagcggccg c 5091

<210> 32
<211> 28
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_32

<400> 32
gcgcgggtacc tagactcacc ccagtgc

28

<210> 33
<211> 30
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_33

<400> 33
ctctactagt ttagatgtag aactcgatgt

30

<210> 34
<211> 6349
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> PCLIK5MCS

<220>
<221> misc_feature
<222> (42)..(177)
<223> PmetA

<220>
<221> misc_feature
<222> (178)..(1311)
<223> metA

<220>
<221> misc_feature
<222> (1727)..(2518)
<223> KanR

<220>

<221> misc_feature
<222> (2785)..(3645)
<223> Orf1

<220>
<221> misc_feature
<222> (3791)..(4465)
<223> Ori-EC complement

<220>
<221> misc_feature
<222> (4799)..(5920)
<223> Rep Protein

<400> 34

tcgatttaaa tctcgagagg cctgacgtcg ggcccgggtac ctagactcac cccagtgctt 60
aaagcgctgg gtttttcttt ttcagactcg tgagaatgca aactagacta gacagagctg 120
tccatataca ctggacgaag ttttagtctt gtccacccag aacaggcggt tattttcatg 180
caccctcg cgccttcagg tcaacttgaa atccaagcga tcggtgatgt ctccaccgaa 240
gccggagcaa tcattacaaa cgctgaaatc gcctatcacc gctgggggtga ataccgcgta 300
gataaagaag gacgcagcaa tgtcgttctc atcgaacacg ccctcactgg agattccaac 360
gcagccgatt ggtgggctga cttgctcggg cccggcaaag ccatcaacac tgatatttac 420
tgcgatgatct gtaccaacgt catcggtggg tgcaacgggt ccaccggacc tggctccatg 480
catccagatg gaaatttctg gggtaatcgc ttccccgcca cgtccattcg tgatcaggta 540
aacgccgaaa aacaattcct cgacgcactc ggcatcacca cggtcgccgc agtacttggg 600
ggttccatgg gtggtgcccg caccctagag tgggccgcaa tgtaccaga aactggtggc 660
gcagctgctg ttcttgagcgt ttctgcacgc gccagcgctt ggcaaatecg cattcaatcc 720
gcccaaatta aggcgattga aaacgaccac cactggcacg aaggcaacta ctacgaatcc 780
ctgcaacc cagccaccgg actcggcgcc gcccgacgca tcgcccacct cacctaccgt 840
ggcgaactag aaatcgacga acgcttcggc accaaagccc aaaagaacga aaaccactc 900
ggtccctacc gcaagcccga ccagcgcttc gccgtggaat cctacttgga ctaccaagca 960
gacaagctag tacagcgttt cgacgccggc tcctacgtct tgctcaccga cgccctcaac 1020
cgccacgaca ttggtcgcga ccgcggaggc ctcaacaagg cactcgaatc catcaaagtt 1080
ccagtccttg tcgcaggcgt agataccgat attttgtacc cctaccacca gcaagaacac 1140
ctctccagaa acctgggaaa tctactggca atggcaaaaa tcgtatcccc tgtcggccac 1200
gatgctttcc tcaccgaaag ccgccaaatg gatcgcatcg tgaggaactt cttcagcctc 1260
atctccccag acgaagacaa cccttcgacc tacatcgagt tctacatcta aactagttcg 1320
gacctaggga tatcgtcgac atcgatgctc ttctgcgtta attaacaatt gggatcctct 1380
agacccggga tttaaategc tagcgggctg ctaaaggaag cggaacacgt agaaagccag 1440

tccgcagaaa cgggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct ggacaagggga 1500
aaacgcaagc gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga 1560
ctgggcggtt ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc cctctggtaa 1620
ggttgggaag ccctgcaaag taaactggat ggctttcttg ccgccaagga tctgatggcg 1680
caggggatca agatctgac aagagacagg atgaggatcg tttcgcataa ttgaacaaga 1740
tggattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc 1800
acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc 1860
ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc 1920
gcggctatcg tggctggcca cgacgggcgt tccttgccga gctgtgctcg acgttgtcac 1980
tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc 2040
tcaccttgct cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac 2100
ctgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaac catcgcatcg agcgagcacg 2160
tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct 2220
cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcgatg cccgacggcg aggatctcgt 2280
cgtgacccat ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatgggtg gaaaatggcc gcttttcttg 2340
attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac 2400
ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg 2460
tatcgccgct cccgattcgc agcgcatcgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg 2520
agcgggactc tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat 2580
ttcgattcca ccgccgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc 2640
cgctggatga tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgcca cgctagcggc 2700
cgccggccg gcccggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag 2760
gcgctcttcc gcttcctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc 2820
ggatatcagct cactcaaagg cggtataacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg 2880
aaagaacatg tgagcaaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct 2940
ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca 3000
gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct 3060
cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc 3120
gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctgagttcgg tgtaggtcgt 3180
tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc cccggttcag cccgaccgct gcgccttata 3240
cggtaactat cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc 3300
cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg 3360

gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatattggt atctgcgctc tgctgaagcc 3420
agttaccttc ggaaaaagag ttggttagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag 3480
cgggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga 3540
tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat 3600
tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaaagg ccggccgcgg 3660
ccgcgcaaag tcccgccttcg tgaaaatttt cgtgccgcgt gattttccgc caaaaacttt 3720
aacgaacgtt cgttataatg gtgtcatgac cttcacgacg aagtactaaa attggcccga 3780
atcatcagct atggatctct ctgatgtcgc gctggagtcc gacgcgctcg atgctgccgt 3840
cgatttaaaa acggtgatcg gatttttccg agctctcgat acgacggacg cgccagcatc 3900
acgagactgg gccagtgccg cgagcgacct agaaactctc gtggcggatc ttgaggagct 3960
ctgacgag ctgcgtgctc ggccagcgcc aggaggacgc acagtagtgg aggatgcaat 4020
cagttgcgcc tactgcggtg gcctgattcc tccccggcct gacccgcgag gacggcgcg 4080
aaaatattgc tcagatgcgt gtcgtgccgc agccagccgc gagcgcgcca acaaacgcca 4140
cgccgaggag ctggaggcgg ctaggtcgca aatggcgctg gaagtgcgtc ccccgagcga 4200
aatTTTggcc atggtcgtca cagagctgga agcggcagcg agaattatcg cgatcgtggc 4260
ggtgcccgcga ggcatgacaa acatcgtaaa tgccgcgttt cgtgtgccgt ggccgcccag 4320
gacgtgtcag cgccgccacc acctgcaccg aatcggcagc agcgtcgcgc gtcgaaaaag 4380
cgcacaggcg gcaagaagcg ataagctgca cgaatacctg aaaaatgttg aacgccccgt 4440
gagcggtaac tcacagggcg tcggctaacc ccagtccaa acctgggaga aagcgtcaa 4500
aaatgactct agcggattca cgagacattg acacaccggc ctggaaattt tccgctgatc 4560
ctcgacac ccatcccag ctcgcgctgc gatcacgtgg ctggacgagc gaagaccgcc 4620
gcgaattcct cgctcacctg ggcagagaaa atttccaggg cagcaagacc cgcgacttcg 4680
ccagcgcttg gatcaaagac ccggacacgg agaaacacag ccgaagtat accgagttgg 4740
ttcaaaatcg cttgcccggg gccagtatgt tgctctgacg cacgcgcagc acgcagccgt 4800
gcttgctctg gacattgatg tgccgagcca ccaggccggc gggaaaatcg agcacgtaaa 4860
ccccgaggtc tacgcgattt tggagcgctg ggcacgcctg gaaaaagcgc cagcttggat 4920
cggcgtgaat ccactgagcg ggaaatgcc gctcatctgg ctcatatgat cggtgtatgc 4980
cgcagcaggc atgagcagcc cgaatatgcg cctgctggct gcaacgaccg aggaaatgac 5040
ccgcgttttc ggcgctgacc aggctttttc acataggctg agccgtggcc actgcactct 5100
ccgacgatcc cagccgtacc gctggcatgc ccagcacaat cgcgtggatc gcctagctga 5160
tcttatggag gttgctcgca tgatctcagg cacagaaaaa cctaaaaaac gctatgagca 5220

ggagttttct agcggacggg cacgtatcga agcggcaaga aaagccactg cggaagcaaa 5280
 agcacttgcc acgcttgaag caagcctgcc gagcgccgct gaagcgtctg gagagctgat 5340
 cgacggcgct cgtgtcctct ggactgctcc agggcgctgcc gcccgatgat agacggcttt 5400
 tcgccacgct ttgactgtgg gataccagtt aaaagcggct ggtgagcgcc taaaagacac 5460
 caagggcat cgagcctacg agcgtgccta caccgtcgct caggcggtcg gaggaggccg 5520
 tgagcctgat ctgccgccgg actgtgaccg ccagacggat tggccgcgac gtgtgcgcgg 5580
 ctacgtcgct aaaggccagc cagtcgtccc tgctcgtcag acagagacgc agagccagcc 5640
 gaggcgaaaa gctctggcca ctatgggaag acgtggcggt aaaaaggccg cagaacgctg 5700
 gaaagacca aacagtgagt acgcccagc acagcgagaa aaactagcta agtccagtca 5760
 acgacaagct aggaaagcta aaggaaatcg cttgaccatt gcaggttggt ttatgactgt 5820
 tgaggagag actggctcgt ggccgacaat caatgaagct atgtctgaat ttagcgtgtc 5880
 gtcagacc gtgaatagag cacttaaggt ctgcgggcat tgaacttcca cgaggacgcc 5940
 gaaagcttcc cagtaaagt gccatctcgt aggcagaaaa cggttcccc gtagggtctc 6000
 tctcttgcc tcctttctag gtcgggctga ttgctcttga agctctctag gggggctcac 6060
 accataggca gataacgttc ccaccggct cgcctcgtaa ggcacaagg actgctcca 6120
 aagatcttca aagccactgc cgcgactgcc ttcgcgaagc cttgccccgc ggaaatttcc 6180
 tccaccgagt tcgtgcacac ccctatgcca agcttctttc accctaaatt cgagagattg 6240
 gattcttacc gtggaaattc ttcgcaaaaa tcgtcccctg atcgcccttg cgacgttggc 6300
 gtcggtgccg ctggttgccg ttggcttgac cgacttgatc agcggccgc 6349

<210> 35
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <223> SEQ_ID_35

<400> 35
 gagactcgag agctgccaat tattccggg

29

<210> 36
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <223> SEQ_ID_36

<400> 36
 cctgaaggcg cgagggtggg catgggtaaa aaatcctttc g

41

<210> 37
<211> 19
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_37

<400> 37
cccaccctcg cgccttcag

19

<210> 38
<211> 18
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_38

<400> 38
gggtacat tgcggccc

18

<210> 39
<211> 6386
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> PCLIK5MCS

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(196)
<223> Psod

<220>
<221> misc_feature
<222> (197)..(1330)
<223> metA

<220>
<221> misc_feature
<222> (1752)..(2543)
<223> KanR

<220>
<221> misc_feature
<222> (2810)..(3670)
<223> Ori-Ec (pMB) complement

<220>
<221> misc_feature
<222> (3816)..(4490)
<223> Orf1

<220>
<221> misc_feature
<222> (4824)..(5945)
<223> Rep Protein

<400> 39

tcgagagctg ccaattattc cgggcttgtg acccgctacc cgataaatag gtcggctgaa 60
aaatttcggt gcaatatcaa caaaaaggcc tatcattggg aggtgtcgca ccaagtactt 120
ttgcgaagcg ccatctgacg gatthttcaaa agatgtatat gctcgggtgcg gaaacctacg 180
aaaggatttt ttacccatgc ccaccctcgc gccttcaggt caacttgaaa tccaagcgat 240
cggatgatgtc tccaccgaag ccggagcaat cattacaaac gctgaaatcg cctatcaccg 300
ctgggggtgaa taccgcgtag ataaagaagg acgcagcaat gtcgtttctca tcgaacacgc 360
cctcactgga gattccaacg cagccgattg gtgggctgac ttgctcggtc ccggcaaagc 420
catcaacact gatatttact gcgtgatctg taccaacgtc atcgggtggtt gcaacgggtt 480
caccggacct ggctccatgc atccagatgg aaattttctgg ggtaatcgct tccccgccac 540
gtccattcgt gatcaggtaa acgccgaaaa acaattcctc gacgcactcg gcacaccac 600
ggtcgccgca gtacttggtg gttccatggg tgggtgccgc accctagagt gggccgcaat 660
accagaa actggtggcg cagctgctgt tcttgagtt tctgcacgcg ccagcgctg 720
gcaaatcggc attcaatccg cccaaattaa ggcgattgaa aacgaccacc actggcacga 780
aggcaactac tacgaatccg gctgcaacc agccaccgga ctccggcgccg cccgacgcac 840
cgcccacctc acctaccgtg gcgaactaga aatcgacgaa cgcttcggca ccaaagccca 900
aaagaacgaa aaccactcg gtccctaccg caagcccgc cagcgcttcg ccgtggaatc 960
ctacttgga caccaagcag acaagctagt acagcgtttc gacgccggct cctacgtctt 1020
gctcaccgac gccctcaacc gccacgacat tggtcgagc cgccggaggcc tcaacaaggc 1080
actcgaatcc atcaaagttc cagtccttgt cgcaggcgta gataccgata ttttgtaccc 1140
ctaccaccag caagaacacc tctccagaaa cctgggaaat ctactggcaa tggcaaaaat 1200
gtatccct gtcggccacg atgctttcct caccgaaagc cgccaaatgg atcgcatcgt 1260
aggaaactt ttcagcctca tctccccaga cgaagacaac ccttcgacct acatcgagtt 1320
ctacatctaa catatgacta gttcggacct agggatatcg tcgacatcga tgctcttctg 1380
cgtaatttaa caattgggat cctctagacc cgggatttaa atcgctagcg ggctgctaaa 1440
ggaagcggaa cacgtagaaa gccagtccgc agaaacgggtg ctgaccccg atgaatgtca 1500
gctactgggc tatctggaca agggaaaacg caagcgcaaa gagaaagcag gtagcttgca 1560
gtgggcttac atggcgatag ctagactggg cggttttatg gacagcaagc gaaccggaat 1620
tgccagctgg ggcgcctct ggtaagggtg ggaagccctg caaagtaaac tggatggctt 1680
tcttgccgcc aaggatctga tggcgaggg gatcaagatc tgatcaagag acaggatgag 1740
gatcgtttcg catgattgaa caagatggat tgcacgcagg ttctccggcc gcttgggtgg 1800
agaggctatt cggctatgac tgggcacaa agacaatcgg ctgctctgat gccgccgtgt 1860
tccggctgtc agcgcagggg cgcccggtt tttttgtcaa gaccgacctg tccggtgccc 1920

tgaatgaact gcaggacgag gcagcgcggc tategtggct ggccacgacg ggcgttcctt 1980
gcgcagctgt gctcgacgtt gtcactgaag cgggaaggga ctggctgcta ttgggcgaag 2040
tgccggggca ggatctcctg tcatctcacc ttgctcctgc cgagaaagta tccatcatgg 2100
ctgatgcaat gcggcggctg catacgcttg atccggctac ctgcccattc gaccaccaag 2160
cgaaacatcg catcgagcga gcacgtactc ggatggaagc cggctctgtc gatcaggatg 2220
atctggacga agagcatcag gggctcgcgc cagccgaact gttcgccagg ctcaaggcgc 2280
gcatgcccga cggcgaggat ctcgctcgtga cccatggcga tgcctgcttg ccgaatatca 2340
tggtggaaaa tggccgcttt tctggattca tcgactgtgg ccggctgggt gtggcggacc 2400
gctatcagga catagcgttg gctaccctg atattgctga agagcttggc ggcgaatggg 2460
ctgaccgctt cctcgtgctt tacggtatcg ccgctcccga ttccgcagcg atcgcttct 2520
cgcttctt tgacgagttc ttctgagcgg gactctgggg ttcgaaatga ccgaccaagc 2580
gacgccaac ctgccatcac gagatttcga ttccaccgcc gccttctatg aaagggtggg 2640
cttcggaatc gttttccggg acgccggctg gatgatctc cagcgcgggg atctcatgct 2700
ggagttcttc gccacgcta gcggcgcgcc ggccggcccg gtgtgaaata ccgcacagat 2760
gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcct cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc 2820
gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggtat cagctcactc aaaggcggtg atacggttat 2880
ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca 2940
ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgccc cctgacgagc 3000
atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaacc gacaggacta taaagatacc 3060
aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg 3120
tcactgtc cgcttttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta 3180
ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg 3240
ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggtagac 3300
acgacttatc gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag 3360
gcggtgctac agagttcttg aagtgggtggc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat 3420
ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggg agctcttgat 3480
ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcgggt gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc 3540
gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt 3600
ggaacgaaaa ctcacgttaa gggatttttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct 3660
agatcctttt aaaggccggc cgcgcccgcg caaagtcccg cttcgtgaaa attttcgtgc 3720
cgcgatgatt tccgcaaaa actttaacga acgttcgtta taatgggtgtc atgaccttca 3780

cgacgaagta ctaaaattgg cccgaatcat cagctatgga tctctctgat gtcgcgctgg 3840
agtccgacgc gctcgatgct gccgtcgatt taaaaacggt gatcggattt ttccgagctc 3900
tcgatacgac ggacgcgcca gcatcacgag actgggcccag tgccgcgagc gacctagaaa 3960
ctctcgtggc ggatcttgag gagctggctg acgagctgcg tgctcggcca gcgccaggag 4020
gacgcacagt agtggaggat gcaatcagtt gcgcctactg cgggtggcctg attcctcccc 4080
ggcctgacct gcgaggacgg cgcgcaaaat attgctcaga tgcgtgtcgt gccgcagcca 4140
gccgcgagcg cgccaacaaa cgccacgccg aggagctgga ggccggctagg tcgcaaatgg 4200
cgctggaagt gcgtcccccg agcgaaattt tggccatggt cgtcacagag ctggaagcgg 4260
cagcgagaat tatcgcgatc gtggcggtgc ccgcaggcat gacaaacatc gtaaattgccg 4320
cgtttcgtgt gccgtggccg cccaggacgt gtcagcgccg ccaccacctg caccgaatcg 4380
gcagcagcgt cgcgcgtcga aaaagcgcac aggcggcaag aagcgataag ctgcacgaat 4440
ctgaaaaa tgttgaacgc cccgtgagcg gtaactcaca gggcgtcggc taacccccag 4500
tccaaacctg ggagaaagcg ctcaaaaatg actctagcgg attcacgaga cattgacaca 4560
ccggcctgga aattttccgc tgatctgttc gacaccatc ccgagctcgc gctgcgatca 4620
cgtggctgga cgagcgaaga ccgccgcgaa ttctcgcctc acctgggcag agaaaatttc 4680
cagggcagca agaccgcga cttcgccagc gcttggatca aagaccgga cacggagaaa 4740
cacagccgaa gttataccga gttggttcaa aatcgcttgc ccggtgccag tatgttgctc 4800
tgacgcacgc gcagcacgca gccgtgcttg tcctggacat tgatgtgccg agccaccagg 4860
ccggcgggaa aatcgagcac gtaaaccctg aggtctacgc gattttggag cgctgggcac 4920
gcctggaaaa agcgcagct tggatcggcg tgaatccact gagcgggaaa tgccagctca 4980
tctggctcat tgatccggtg tatgccgcag caggcatgag cagcccgaat atgcgcctgc 5040
ggctgcaac gaccgaggaa atgaccgcg ttttcggcgc tgaccaggct ttttcacata 5100
ggctgagccg tggccactgc actctccgac gatcccagcc gtaccgctgg catgccagc 5160
acaatcgctt ggatcgctta gctgatctta tggagggttc tcgcatgac tcaggcacag 5220
aaaaaccta aaaacgctat gagcaggagt tttctagcgg acgggcacgt atcgaagcgg 5280
caagaaaagc cactgcggaa gcaaaagcac ttgccacgct tgaagcaagc ctgccgagcg 5340
ccgctgaagc gtctggagag ctgatcgacg gcgtccgtgt cctctggact gctccagggc 5400
gtgccgcccg tgatgagacg gcttttcgcc acgctttgac tgtgggatac cagttaaaag 5460
cggctggtga gcgcctaaaa gacaccaagg gtcacgagc ctacgagcgt gcctacaccg 5520
tcgctcaggc ggtcggagga ggccgtgagc ctgatctgcc gccggactgt gaccgccaga 5580
cggattggcc gcgacgtgtg cgcggctacg tcgctaaagg ccagccagtc gtcctgctc 5640
gtcagacaga gacgcagagc cagccgaggc gaaaagctct ggccactatg ggaagacgtg 5700

gcggtaaaaa ggccgcagaa cgctggaaag acccaaacag tgagtacgcc cgagcacagc 5760
 gagaaaaact agctaagtcc agtcaacgac aagctaggaa agctaaagga aatcgcttga 5820
 ccattgcagg ttggtttatg actgttgagg gagagactgg ctctgtggccg acaatcaatg 5880
 aagctatgtc tgaatttagc gtgtcacgtc agaccgtgaa tagagcactt aaggtctgcg 5940
 ggcatagaac ttccacgagg acgccgaaag cttcccagta aatgtgccat ctctgtaggca 6000
 gaaaacgggt cccccgtagg gtctctctct tggcctcctt tctagggtcgg gctgattgct 6060
 cttgaagctc tctagggggg ctcacaccat aggcagataa cgttccccac cggctcgcct 6120
 cgtaagcgca caaggactgc tcccaaagat cttcaaagcc actgccgcga ctgccttcgc 6180
 gaagccttgc cccgcggaaa tttcctccac cgagttcgtg cacacccta tgccaagctt 6240
 ctttcaccct aaattcgaga gattggattc ttaccgtgga aattcttcgc aaaaatcgtc 6300
 ctgatcgc ccttgcgacg ttggcgctcg tgccgctggg tgcgcttggc ttgaccgact 6360
 ctgatcagcg ccgctcgatt taaatc 6386

<210> 40
 <211> 1005
 <212> DNA
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>
 <223> FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATASE

<400> 40
 atgaaccta agaaccccga aacgccagac cgtaaccttg ctatggagct ggtgagagtt 60
 acggaagcag ctgcactggc ttctggacgt tgggttgagc gtggcatgaa gaatgaaggc 120
 gacggtgccg ctgttgacgc catgcgccag ctcatcaact cagtgacct gaagggcgctc 180
 ctgttatcg gcgagggcga aaaagacgaa gctccaatgc tgtacaacgg cgaagaggtc 240
 ggaaccggct ttggacctga ggttgatatc gcagttgacc cagttgacgg caccaccctg 300
 atggctgagg gtcgccccaa cgcaatttcc attctcgag ctgcagagcg tggcaccatg 360
 tacgatccat cctccgtctt ctacatgaag aagatcgccg tgggacctga ggccgcaggc 420
 aagatcgaca tcgaagctcc agttgcccac aacatcaacg cgggtggcaaa gtccaaggga 480
 atcaaccctt ccgacgtcac cgttgctcgt cttgaccgtc ctgccacat cgaactgatc 540
 gcagacattc gtcgtgcagg cgcaaagggt cgtctcatct ccgacggcga cgttgacagg 600
 gcagttgcag cagctcagga ttccaactcc gtggacatca tgatgggcac cggcggaacc 660
 ccagaaggca tcatcactgc gtgcgccatg aagtgcattg gtggcgaaat ccagggcatc 720
 ctggccccaa tgaacgattt cgagcgccag aaggcacacg acgctgggtt ggttcttgat 780
 caggttctgc acaccaacga tctggtgagc tccgacaact gctacttcgt ggcaaccggg 840

gtgaccaacg gtgacatgct ccgtggcggtt tcctaccgcg caaacggcgc aaccacccgt 900
 tccctgggtta tgcgcgcaaa gtcaggcacc atccgccaca tcgagtctgt ccaccagctg 960
 tccaagctgc aggaatactc cgtgggttgac tacaccaccg cgacc 1005

<210> 41
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 41
 Met Asn Leu Lys Asn Pro Glu Thr Pro Asp Arg Asn Leu Ala Met Glu
 1 5 10 15
 Leu Val Arg Val Thr Glu Ala Ala Ala Leu Ala Ser Gly Arg Trp Val
 20 25 30
 Gly Arg Gly Met Lys Asn Glu Gly Asp Gly Ala Ala Val Asp Ala Met
 35 40 45
 Arg Gln Leu Ile Asn Ser Val Thr Met Lys Gly Val Val Val Ile Gly
 50 55 60
 Glu Gly Glu Lys Asp Glu Ala Pro Met Leu Tyr Asn Gly Glu Glu Val
 65 70 75 80
 Gly Thr Gly Phe Gly Pro Glu Val Asp Ile Ala Val Asp Pro Val Asp
 85 90 95
 Gly Thr Thr Leu Met Ala Glu Gly Arg Pro Asn Ala Ile Ser Ile Leu
 100 105 110
 Ala Ala Ala Glu Arg Gly Thr Met Tyr Asp Pro Ser Ser Val Phe Tyr
 115 120 125
 Met Lys Lys Ile Ala Val Gly Pro Glu Ala Ala Gly Lys Ile Asp Ile
 130 135 140
 u Ala Pro Val Ala His Asn Ile Asn Ala Val Ala Lys Ser Lys Gly
 145 150 155 160
 Ile Asn Pro Ser Asp Val Thr Val Val Val Leu Asp Arg Pro Arg His
 165 170 175
 Ile Glu Leu Ile Ala Asp Ile Arg Arg Ala Gly Ala Lys Val Arg Leu
 180 185 190
 Ile Ser Asp Gly Asp Val Ala Gly Ala Val Ala Ala Ala Gln Asp Ser
 195 200 205
 Asn Ser Val Asp Ile Met Met Gly Thr Gly Gly Thr Pro Glu Gly Ile
 210 215 220
 Ile Thr Ala Cys Ala Met Lys Cys Met Gly Gly Glu Ile Gln Gly Ile
 225 230 235 240
 Leu Ala Pro Met Asn Asp Phe Glu Arg Gln Lys Ala His Asp Ala Gly
 245 250 255
 Leu Val Leu Asp Gln Val Leu His Thr Asn Asp Leu Val Ser Ser Asp

260					265					270						
Asn	Cys	Tyr	Phe	Val	Ala	Thr	Gly	Val	Thr	Asn	Gly	Asp	Met	Leu	Arg	
275					280					285						
Gly	Val	Ser	Tyr	Arg	Ala	Asn	Gly	Ala	Thr	Thr	Arg	Ser	Leu	Val	Met	
290					295					300						
Arg	Ala	Lys	Ser	Gly	Thr	Ile	Arg	His	Ile	Glu	Ser	Val	His	Gln	Leu	
305					310					315					320	
Ser	Lys	Leu	Gln	Glu	Tyr	Ser	Val	Val	Asp	Tyr	Thr	Thr	Ala	Thr		
325					330					335						

<210> 42
 <211> 6
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <223> POTENTIELLE_-10-REGION_1
 <400> 42
 tgcaat

6

<210> 43
 <211> 7
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <223> POTENTIELLE_-10-REGION_2
 <400> 43
 tatcatt

7

<210> 44
 <211> 7
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <223> RIBOSOMALE_BINDUNGSSTELLE\SHINE-DALGARNO
 <400> 44
 gaaagga

7